



**Susana Raquel de
Sousa Pereira**

**Produção, isolamento e caracterização química do
exopolissacarídeo do fungo da podridão branca da
madeira *Trametes versicolor***



**Susana Raquel de
Sousa Pereira**

**Produção, isolamento e caracterização química do
exopolissacarídeo do fungo da podridão branca da
madeira *Trametes versicolor***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais Derivados de Recursos Renováveis, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família por me apoiar durante o meu percurso académico

o júri

presidente

Prof. Doutor Carlos de Pascoal Neto
professor catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Susana Maria Almeida Cardoso
professora adjunta equiparada da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança

agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Ana Xavier pela proposta do tema de trabalho, pela orientação científica e pelo apoio dado ao longo da realização do trabalho.

Agradeço ao Professor Doutor Manuel António Coimbra por ter aceite a orientação deste trabalho, pela orientação científica e pelo seu apoio.

Agradeço ao Professor Doutor Fernando Domingues pelo apoio na obtenção dos resultados de cromatografia de alta eficiência.

Agradeço à Doutora Iola Duarte pela análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear efectuada.

Agradeço à Élia Maricato pela análise termogravimétrica efectuada.

Agradeço ao meu colega de laboratório, Hugo, pelo apoio, colaboração e amizade demonstrada.

Agradeço aos colegas do laboratório de bioquímica, pela ajuda e companheirismo transmitidos.

Aos meus pais e amigos, um agradecimento especial, pelo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

palavras-chave

Trametes versicolor, exopolissacarídeo, extracção, solubilidade, beta-glucana

resumo

O *Trametes versicolor* é um fungo da podridão branca da madeira com potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira. Segundo a literatura, este fungo produz também uma (1-3)- β -glucana com actividade imunomoduladora, propriedades anti-tumorais e anti-microbianas. O objectivo deste trabalho foi produzir, isolar, solubilizar e caracterizar quimicamente o exopolissacarídeo (EPS) do fungo *T. versicolor*. O fungo foi produzido por fermentação em cultura líquida, tendo o material polimérico sido fraccionado de acordo com a sua solubilidade em soluções de etanol. As fracções obtidas foram analisadas quanto à composição em açúcares neutros, concentração de ácidos urónicos, massa molecular relativa e ligações glicosídicas. Foi também efectuada uma análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) a uma das amostras.

O material que precipitou em 80% de etanol continha 95% de açúcares neutros, sendo a glucose o açúcar maioritário (98%). Os restantes 2% de açúcares correspondem à arabinose e xilose. Apesar da literatura referir a solubilidade desta glucana em água, tal não se verificou após a precipitação em etanol, mesmo quando foi tentada a solubilização a 80°C. No entanto, este EPS apresentou solubilidade (3,3 mg/mL) em soluções alcalinas de NaOH. Verificou-se também que este polissacarídeo apresentou maior resistência à hidrólise ácida.

Uma vez que o EPS recolhido era solúvel no meio de cultura mas se tornava insolúvel em água após a precipitação em etanol, foi tentada a sua recolha por evaporação de água do meio. À medida que a solução foi concentrada foi obtido um precipitado rico em glucose e com composição idêntica ao EPS anteriormente descrito. A fracção contendo o material solúvel também foi analisada, verificando-se que continha 29% de açúcares neutros, sendo a manose o principal açúcar (52%). Esta fracção era também composta por 28% de glucose, 15% de galactose e 5% de outros açúcares. A análise por RMN mostrou que esta amostra possuía uma quantidade elevada de componentes provenientes do extracto de levedura presente no meio de cultura (α -mananas provenientes de manoproteínas).

Este estudo permitiu verificar que o EPS produzido em meio líquido pelo *Trametes versicolor*, quando isolado do meio, é insolúvel em água mas solúvel em soluções alcalinas. A massa molecular do EPS é 225 kDa. A análise de metilação e RMN revelou que as suas principais ligações glicosídicas são a glucose em ligação $\alpha(1,4)$ e $\beta(1,3)$. O EPS estudado é diferente dos polissacarídeos encontrados na literatura, como o polissacaropeptídeo (PSP) e o polissacaropeptídeo Krestin (PSK), entre outros.

keywords

Trametes versicolor, exopolysaccharide, extraction, solubility, beta-glucan

abstract

Trametes versicolor is a white-rot fungus with oxidative potentialities for pulp and paper industry. This fungus produces an exopolysaccharide (EPS), a (1→3)- β -glucan, with claimed anticancer, antimicrobial and immunomodulatory activities. The aim of this study was to produce, isolate, solubilise and characterise chemically the EPS produced by *T. versicolor*. The fungus was produced by a submerged-culture fermentation and the EPS was fractionated according to its solubility in ethanol solutions. Neutral monosaccharides and uronic acids composition of the isolated fractions were performed. The average molecular weight and the composing glycosidic linkages were also investigated. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) was performed to one of the samples.

The fraction which precipitated in 80% ethanol was composed by 95% of neutral sugars and glucose was the predominant one (98%), with traces of arabinose and xylose. In spite the fact that the different studies cited in literature refer that this polysaccharide is soluble in water, its solubility was not verified, even when the suspension was heated at 80°C. However, this EPS is soluble (3,3 mg/mL) in NaOH alkali solutions and has resistance to acid hydrolysis.

Since the EPS is soluble in the culture medium but becomes insoluble in water after ethanol precipitation, its recovery was attempted by evaporation of the culture medium. As the solution has been concentrated, a precipitate rich in glucose, with a composition identical to the former, was obtained. The remaining soluble fraction was composed by 29% neutral sugars. Mannose was the main sugar (52%), followed by 28% glucose, 15% galactose and 5% of other sugars. The analysis by NMR showed that the sample contained high concentration of compounds from the yeast extract component of the culture medium (α -mannans from mannoproteins).

This study allowed to observe that the EPS produced in the liquid medium by *Trametes versicolor* is, when separated from the medium, insoluble in water but soluble in alkali solutions. Its average molecular weight is 225 kDa. Glycosidic-linkage analysis by methylation revealed that the main glycosidic linkages were α (1,4) and β (1,3)-glucose. This EPS is different from the polysaccharides found in literature, like Polysaccharopeptide (PSP) or Polysaccharopeptide Krestin (PSK), among others.

Índice

1. Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. Fungos	3
1.1.1. Fisiologia	3
1.1.1. Classificação taxonómica	5
1.1.2. <i>Trametes versicolor</i>	6
1.2. Polissacarídeos Fúngicos	7
1.2.1. Relevância	7
1.2.2. Beta-Glucanas	8
1.2.3. Polissacarídeos produzidos por <i>T. versicolor</i>	11
a) Produção e Extracção	11
b) Características químicas e fisiológicas	12
1.3. Análise de Polissacarídeos.....	14
1.3.1. Hidrólise	14
1.3.2. Derivatização	15
a) Identificação de monossacarídeos	15
b) Identificação das ligações glicosídicas	16
1.4. Objectivos	17
2. Metodologias.....	19
2.1. Origem das fracções analisadas	21
2.2. Esterilização de Material	22
2.3. Cultura dos fungos	23
2.3.1. Cultura em placas de Petri.....	23
2.3.2. Cultura em meio líquido.....	23
2.4. Extracção do exopolissacarídeo	24
2.4.1. Separação da biomassa fúngica	24
2.4.2. Precipitação em Etanol.....	24
2.4.3. Precipitação por evaporação de água	24
2.5. Solubilização do EPS	25
2.5.1. Água	25
2.5.2. Solução de NaOH	25

2.6.	Quantificação da biomassa seca.....	25
2.6.1.	Secagem rápida da biomassa por Infravermelho	25
2.6.2.	Quantificação da biomassa por peso seco	26
2.7.	Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-300 HR	26
2.8.	Análise de Açúcares	27
2.8.1.	Determinação colorimétrica de açúcares totais (fenol-ácido sulfúrico).....	27
2.8.2.	Identificação e quantificação de açúcares neutros	27
2.8.3.	Quantificação dos ácidos urónicos pelo método colorimétrico	29
2.8.4.	Ácidos Urónicos - HPLC	29
2.9.	Análise das ligações glicosídicas	30
2.9.1.	Metilação	30
2.9.2.	Hidrólise e derivatização dos açúcares parcialmente metilados a acetatos de alditol parcialmente metilados	30
2.10.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	31
2.11.	Análise termogravimétrica.....	31
3.	Resultados e Discussão	33
3.1.	Determinação da biomassa produzida	35
3.2.	Extracção com etanol	35
3.2.1.	Solubilização em água.....	35
a)	Determinação e identificação dos açúcares neutros	36
3.2.2.	Solubilização em NaOH.....	37
a)	Cromatografia de exclusão molecular	39
3.3.	Extracção por evaporação de água.....	40
3.3.1.	Determinação e identificação dos açúcares neutros.....	40
3.3.2.	Determinação de ácidos urónicos por HPLC	42
3.3.3.	Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	43
3.3.4.	Análise das ligações glicosídicas	45
3.4.	Análise termogravimétrica.....	49
3.5.	Determinação e identificação dos açúcares neutros e comparação de condições de hidrólise	51
4.	Conclusões	53

5. Referências Bibliográficas.....	57
---	-----------

Índice Figuras

Figura 1.1: Representação de um segmento curto do polissacarídeo quitina (Nelson e Cox 2004).	4
Figura 1.2: Fotografia de corpos de frutificação de <i>Trametes versicolor</i> (Cheng e Leung 2008).	7
Figura 1.3: Representação estrutural da curdlana (Grandpierre <i>et al.</i> 2008).	9
Figura 1.4: Representação esquemática da conformação das curdlanas à temperatura ambiente (McIntosh <i>et al.</i> 2005).	10
Figura 1.5: Hidrólise da ligações glicosídicas de uma (1→3)-β-glucana em meio ácido, originando a sua unidade monomérica a β-D-glucose (Carey 2006).	14
Figura 1.6: Redução da glucose a glucitol, por acção do boro-hidreto de sódio (Halpern 1997).	15
Figura 1.7: Reacção de esterificação do D-glucitol pelo anidrido acético (Carey 2006).	16
Figura 1.8: Reacção de metilação de uma β-glucana pelo iodeto de metilo (Carey 2006).	17
Figura 2.1: Diagrama resumo sobre a origem das fracções analisadas.	22
Figura 3.1: Biomassa produzida por <i>Trametes versicolor</i> no meio YM otimizado.	35
Figura 3.2: Percentagem de EPS, em diferentes concentrações, solúvel em NaOH com várias molaridades.	37
Figura 3.3: Cromatografia de exclusão molecular da fracção solúvel em NaOH (EPS_AI_S) numa coluna Sephacryl S-300 HR.	39
Figura 3.4: Espectro HSQC (¹ H/ ¹³ C) da amostra S_4 liofilizada e redissolvida em D ₂ O.	44
Figura 3.5: Gráfico da análise termogravimétrica da amostra EPS_IQ.	50
Figura 3.6: Gráfico da análise termogravimétrica da amostra Sb_4.	50
Figura 3.7: Composição em açúcares neutros da fracção insolúvel a 80°C (EPS_IQ) sujeita a hidrólise com H ₂ SO ₄ 1M e H ₂ SO ₄ 2M.	51

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Composição do meio Tien & Kirk (Tak) usado para cultura do fungo <i>T. versicolor</i> (Tavares et al. 2005).....	23
Tabela 2.2: Composição do meio Yeast Medium (YM) usado para cultura do fungo <i>T. versicolor</i> (Tavares et al. 2005).....	24
Tabela 3.1: Composição em açúcares neutros das fracções insolúvel a 80 °C (EPS_IQ) e solúvel a 80 °C (EPS_SQ).	36
Tabela 3.2: Concentrações finais de EPS obtidas após solubilização em soluções de NaOH.....	38
Tabela 3.3: Massas moleculares (M_w) e grau de polimerização (D.p.) das fracções da amostra solúvel em NaOH (EPS_AI_S) separadas com uma coluna de exclusão molecular S-300 HR.	40
Tabela 3.4: Composição em açúcares neutros dos diferentes precipitados (PP) e sobrenadantes (S) obtidos.	41
Tabela 3.5: Tempos de retenção dos padrões de açúcar, obtidos por HPLC usando a coluna Rezex RCM.	42
Tabela 3.6: Principais desvios químicos HSQC (^1H - ^{13}C) da amostra Sb_4, atribuídos com base nas respectivas referências bibliográficas.....	45
Tabela 3.7: Composição das ligações glicosídicas das amostras metiladas.	46
Tabela 3.8: Composição em açúcares neutros da fracção insolúvel a 80°C (EPS_IQ).	51

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADN	Ácido desoxirribonucleico	MS	Espectrómetro de massa
Al	Alcalina	Mw	Massa molecular
Ara	Arabinose	NK	Linfócitos citotóxicos
B.p.	Percentagem de ramificações	p	Pirnose
C	Carbono	Pol	Polissacarídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido	PP	Precipitado
D.p.	Grau de polimerização	ppm	Parte por milhão
ELSD	Evaporative light scattering detection	PSK	Polissacaropeptídeo Krestin
EPS	Exopolissacarídeo	PSP	Polissacaropeptídeo
f	Furanose	Q	Quente
FDA	“Food and Drug Administration”	Rha	Ramnose
FID	Detector de ionização de chama	r.p.m.	Rotações por minuto
Gal	Galactose	RMN	Ressonância magnética nuclear
GC	Cromatografia de fase gasosa	S	Solúvel
Glc	Glucose	Sb	Sobrenadante
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	TaK	Meio de cultura Tien and Kirk
HMF	5-hidroximetilfurfural	TFA	Ácido trifluoracético
HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Coherence”	TGA	Análise termogravimétrica
I	Insolúvel	Th	Linfócitos T-reguladores
INETI	Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação	Tk	Linfócitos T-citotóxicos
IPO	Instituto Português de Oncologia	VIH	Vírus da imunodeficiência humana
m	massa	Xyl	Xilose
Man	Manose	YM	Meio de cultura para leveduras
min	Minutos	%mol	Percentagem molar

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Fungos

1.1.1. Fisiologia

Em Microbiologia, o termo fungo designa os organismos eucariotas sem clorofila, com capacidade de produzir esporos e que se alimentam por absorção dos nutrientes do meio. Muitos são patogênicos e infectam plantas e animais, outros formam relações benéficas com alguns organismos (Pelczar *et al.* 1997; Prescott *et al.* 2002).

Juntamente com as bactérias e alguns outros grupos de organismos heterotróficos, os fungos agem como decompositores. Eles degradam materiais orgânicos existentes no ambiente a moléculas orgânicas e inorgânicas simples. Desta forma o carbono, azoto, fósforo, e outros componentes essenciais são libertados e colocados à disposição dos organismos vivos (Pelczar *et al.* 1997; Prescott *et al.* 2002)

Como são organismos eucariotas apresentam no interior da membrana plasmática um citoplasma compartimentado por um sistema de membranas que formam os vários organelos celulares. Apresentam um núcleo bem definido por um invólucro nuclear. Não possuem vacúolos nem plastos, mas têm uma parede celular (Landecker 1982; Pelczar *et al.* 1997; Prescott *et al.* 2002).

A parede celular dos fungos apresenta cerca de 0,2 μm de espessura. Esta poderá ser mais espessa em algumas células especializadas ou esporos. Os principais constituintes da parede celular incluem uma variedade de polissacarídeos, que usualmente representam cerca de 80 a 90% da parede celular. Proteínas, que muitas vezes estão conjugadas com os polissacarídeos, e pequenas quantidades de lípidos são outros constituintes importantes. A maioria dos fungos tem apenas quitina na sua parede celular (Landecker 1982). A quitina é um polissacarídeo, resistente mas flexível, organizado em microfibrilhas (Pelczar *et al.* 1997; Prescott *et al.* 2002). É formado por resíduos de N-acetil-D-glucosamina em ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ como se observa na Figura 1.1 (Nelson e Cox 2004).

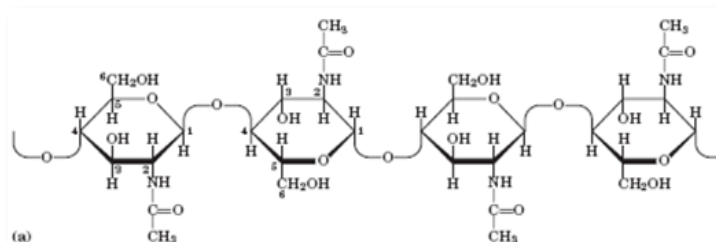


Figura 1.1: Representação de um segmento curto do polissacarídeo quitina (Nelson e Cox 2004).

O corpo de um fungo varia em tamanho e complexidade, podendo ser constituído por uma única célula (levedura) ou por conjunto multicelular (bolor ou cogumelo). Os fungos multicelulares são constituídos por um conjunto de filamentos com cerca de 5 μm de diâmetro que se ramificam repetidamente, designados por hifas (Schlegel 1997). Estas são compostas por uma parede celular exterior e um lúmen interno, que contém o citosol e os organelos. A membrana plasmática rodeia o citoplasma e encontra-se logo a seguir à parede celular. O conjunto das hifas forma o micélio. Existem vários tipos de micélio. O micélio que se desenvolve no interior do substrato e que funciona também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes é chamado de micélio vegetativo. O micélio que se projecta na superfície e cresce acima do meio de cultura é o micélio aéreo. Quando este se diferencia para sustentar os corpos de frutificação, constitui o micélio reprodutivo (Pelczar *et al.* 1997; Prescott *et al.* 2002).

Os fungos, na sua maioria, são saprófitas, garantindo os seus nutrientes a partir de matéria orgânica morta, uma vez que, geralmente estão em contacto directo com os nutrientes no ambiente. As moléculas mais pequenas, como os açúcares simples e aminoácidos, são absorvidas directamente pelas hifas. Macromoléculas como a celulose, amido e proteínas terão de passar por uma fase de pré-digestão, antes dos seus componentes serem absorvidos. Estas são primeiro atacadas por enzimas hidrolíticas libertadas pelo fungo. Deste modo, os fungos são quimio-heterotróficos pois utilizam os compostos orgânicos como fonte de carbono e de energia. O principal polissacarídeo de armazenamento em fungos é o glicogénio. Os fungos geralmente são aeróbios, isto é, requerem oxigénio para o crescimento e podem crescer numa atmosfera de 21% de oxigénio. Fungos anaeróbios obrigatórios podem ser mortos pelo oxigénio e são encontrados no rúmem de bovinos (Landecker 1982; Pelczar *et al.* 1997; Prescott *et al.* 2002).

Em laboratório muitos fungos podem crescer numa mistura simples que contenha açúcar, uma fonte de azoto inorgânico ou orgânico e alguns minerais. Porém alguns podem necessitar de vitaminas. Em geral, os meios de cultura de fungos apresentam uma concentração de açúcares de cerca de 4% e um pH ente 3,8 e 5,6. Esta combinação favorece o crescimento do fungo e inibe o crescimento da maioria das bactérias. Os fungos multicelulares necessitam em média de 7 a 15 dias ou mais de crescimento (Pelczar *et al.* 1997).

1.1.1. Classificação taxonômica

O uso de características moleculares para determinar relações filogenéticas introduziu grandes alterações na taxonomia microbiana. Em 1969 era usado o sistema de classificação dos cinco reinos proposto por Whittaker: *Plantae* (plantas), *Fungi* (fungos), *Animalia* (animais), *Protista* (eucariotas unicelulares), *Monera* (procaríotas). Em 1979 a filogenia molecular revelou que os cinco reinos não representavam cinco grandes linhas evolutivas. Em 1989 Carl Woese propôs o sistema de classificação dos três domínios: *Bacteria* (eubactérias), *Archaea* (arquibactérias) e *Eukarya* (eucariotas). Os fungos encontram-se num dos principais reinos do domínio eucariota, o reino *Fungi* (Pelczar *et al.* 1997; Carlile *et al.* 2001; Prescott *et al.* 2002).

A classificação dos fungos baseia-se nas características dos esporos sexuais, natureza dos seus ciclos de vida e nas características morfológicas do micélio vegetativo ou das suas células. Os micologistas dividem o reino *Fungi* em três principais grupos: fungos limosos, fungos inferiores flagelados e fungos terrestres (Pelczar *et al.* 1997).

Os fungos terrestres são as espécies mais conhecidas entre os fungos. Este grupo inclui leveduras, bolores e cogumelos. A maioria produz um micélio constituído por hifas septadas ou cenocíticas. Neste tipo de fungos não se encontram células móveis. A reprodução assexuada ocorre através de gemulação, bipartição e produção de esporos. A reprodução sexuada caracteriza-se pela produção de zigósporos, ascósporos ou basidiósporos. Considerando essencialmente as variações na reprodução sexuada, os micologistas classificam estes fungos em quatro divisões: *Zigomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Deuteromycota* (Pelczar *et al.* 1997; Prescott *et al.* 2002). Os fungos que não apresentam todos os estágios sexuais conhecidos são designados por fungos imperfeitos e estão na divisão *Deuteromycota*. Quando se descobre o ciclo sexual destes

fungos, são reclassificados entre as outras classes e recebem novos nomes (Pelczar *et al.* 1997). Os basidiomicetos e os ascomicetos são denominados fungos superiores. Esta designação advém da sua estrutura ser consideravelmente mais complexa do que a dos restantes fungos. Os membros pertencentes a este grupo incluem leveduras, fungos filamentosos e dimórficos. O micélio, quando presente, é septado e as suas células podem possuir um ou mais núcleos (Pelczar *et al.* 1997; Prescott *et al.* 2002). Os basidiomicetos podem ser distinguidos dos restantes por possuírem basídio, uma estrutura reprodutiva microscópica em forma de clava onde ocorre a cariogamia e a meiose. Os zigomicetos são formados por hifas cenocíticas. São conhecidos pela produção de um esporo sexuado de parede celular espessa denominado de zigósporo (Pelczar *et al.* 1997).

1.1.2. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor é um macrofungo pertence à classe *Basidiomycetes* (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Tavares *et al.* 2005; Cheng e Leung 2008). É um fungo que se encontra em toros, troncos e galhos durante todo o ano. Pode-se encontrar nas florestas das zonas temperadas da Ásia, Europa e América do Norte. Muitos nomes diferentes têm sido utilizados na literatura para este fungo, incluindo *Agaricus versicolor*, *Boletus versicolor*, *Polyporus versicolor*, *Polystictus versicolor*, *Poria versicolor*, *Coriolus versicolor*, Yun-Zhi (chinês), e Kawaratake (japonês) (Cheng e Leung 2008). Os corpos de frutificação têm uma superfície superior aveludada e marcada com zonas concêntricas de várias cores (vermelho, amarelo, cinzento, verde ou preto) e a margem é normalmente ondulada, como se observa na Figura 1.2 (Cui e Chisti 2003).

Trametes versicolor é um fungo da podridão branca da madeira. A madeira é degradada por uma variedade de espécies de fungos. A maioria destas espécies tem a capacidade de produzir enzimas lenholíticas. Estas enzimas através de mecanismos oxidativos degradam compostos orgânicos presentes em efluentes, como a lenhina e compostos fenólicos em efluentes da indústria papelreira (Roy e Archibald 1993; Asgher *et al.* 2008; Xavier *et al.* 2008) ou fenóis e outros compostos aromáticos em efluentes da indústria têxtil (Asgher *et al.* 2008; Xavier *et al.* 2008).



Figura 1.2: Fotografia de corpos de frutificação de *Trametes versicolor* (Cheng e Leung 2008).

O fungo *T. versicolor* produz também biopolímeros conhecidos pelas suas actividades biológicas. Este fungo foi descrito como sendo benéfico para a saúde humana pela primeira vez no Compêndio de Matéria Médica escrito por Li Shi Zhen durante a dinastia Ming (1368-1644) (Ng 1998; Cheng e Leung 2008). Pesquisas efectuadas constataram que os polissacarídeos produzidos por este fungo são os responsáveis pelos efeitos medicinais atribuídos a *T. versicolor*. Actualmente este fungo é principalmente utilizado como adjuvante no tratamento do cancro. Na medicina tradicional chinesa os extractos deste fungo são indicados para tratamento de diferentes tipos de cancro, hepatites crónicas, infecções do sistema respiratório, urinário e digestivo (Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008).

1.2. Polissacarídeos Fúngicos

1.2.1. Relevância

Na Ásia, em países como a China e o Japão, os cogumelos são cultivados, colhidos e consumidos há centenas de anos. O seu consumo advém das suas características sensoriais e das suas propriedades medicinais (Cui e Chisti 2003; Zhang *et al.* 2006). A maioria destes fungos pertence à classe dos Basidiomicetos. (Zhang *et al.* 2006).

Alguns do carbono assimilado pelos fungos é usado na biossíntese de material celular. Estes materiais podem incluir constituintes da parede celular (quitina), polissacarídeos de armazenamento (glicogénio), e uma grande variedade de outros metabolitos. Muitos destes compostos são polissacarídeos que não estão envolvidos directamente no fornecimento de energia (Landecker 1982). No entanto, fazem parte dos componentes estruturais da parede celular (Zhang *et al.* 2006).

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio (Barbosa *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006). Os EPS microbianos são conhecidos pelas suas propriedades espessantes, gelificantes e emulsificantes (Rinaudo 2008). No entanto, outra das aplicações destes biopolímeros é na saúde humana. Várias pesquisas sobre polissacarídeos fúngicos têm-se concentrado em aplicá-los como agentes anti-cancerígenos. Podem ainda ser utilizados no controlo da formação de leucócitos (efeito anti-inflamatório), no tratamento da artrite reumatóide, na síntese de antigénios para produção de anticorpos, na protecção contra danos oxidativos no ADN e em cosméticos como agentes de hidratação da pele. Estes polissacarídeos interagem também com lipoproteínas de baixa densidade por meio de forças de Van der Waals, o que resulta na eliminação da fracção lipídica do sangue (Chen e Seviour 2007; Rinaudo 2008).

As propriedades físicas e fisiológicas dos polissacarídeos são determinadas pelas diferenças químicas tais como: composição monossacarídica, tipo de ligação glicosídica e grau de ramificação. Grandes variações no grau de ramificação destes polímeros podem afectar a sua solubilidade em água. A composição do meio e as condições de cultura interferem directamente na produção dos EPS microbianos. Os EPS fúngicos são constituídos principalmente por β -D-glucose (Zhang *et al.* 2006).

1.2.2. Beta-Glucanas

As (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas formam uma classe de polissacarídeos produzidos por microrganismos e por algumas plantas (McIntosh *et al.* 2005). Os fungos produzem essencialmente (1 \rightarrow 3)- β ou (1 \rightarrow 3,6)- β -D-glucanas. A epiglucana, produzida pelo fungo *Epicoccum nigrum* tem uma cadeia principal com resíduos de glucose ligados em β -(1 \rightarrow 3) e com duas ramificações β -(1 \rightarrow 6) por cada três resíduos de glucose. A lentinana

é uma glucana produzida por *Lentinula edodes* que contém ligações β -(1 \rightarrow 3) com uma ramificação β -(1 \rightarrow 6) por cada três resíduos de glucose. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* produz também uma (1 \rightarrow 3)- β -glucana com uma ramificação β -(1 \rightarrow 6) por cada três resíduos de glucose, designada por escleroglucana (Chen e Seviour 2007).

As glucanas neutras com uma cadeia principal constituída por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 3) de resíduos de β -Glc_p (Figura 1.3) são designadas por curdlanas (McIntosh *et al.* 2005). Estas glucanas são produzidas por bactérias, na sua maioria pertencentes à espécie *Alcaligenes faecalis* (reclassificada para o género *Agrobacterium*) e *Agrobacterium spp.* (Grandpierre *et al.* 2008).

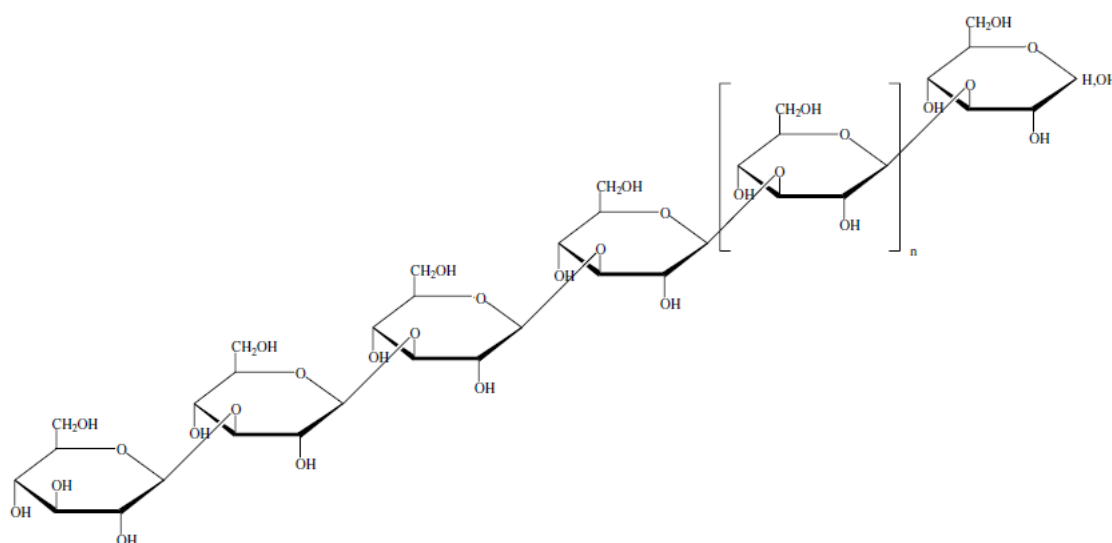


Figura 1.3: Representação estrutural da curdlana (Grandpierre *et al.* 2008).

As curdlanas podem ter até 12000 resíduos de glucose e o seu grau de polimerização é em média de 450. Estes polissacarídeos não são solúveis em água, em alcoóis ou maioria dos solventes orgânicos. No entanto, são solúveis em soluções alcalinas (>0,2M), em dimetilsulfóxido (DMSO) (McIntosh *et al.* 2005; Grandpierre *et al.* 2008) e ácido fórmico. Quando precipitadas a partir de soluções de NaOH ou DMSO, as curdlanas apresentam diferentes morfologias, desde grandes microfibrilhas a fibrilhas fusiformes de vários tamanhos. À temperatura ambiente podem-se formar diferentes estruturas, como as triplas hélices com cerca de duas moléculas por resíduos de glucose ou uma mistura de hélices simples com 20 moléculas de água por resíduo, como se observa na Figura 1.4 (McIntosh *et al.* 2005).

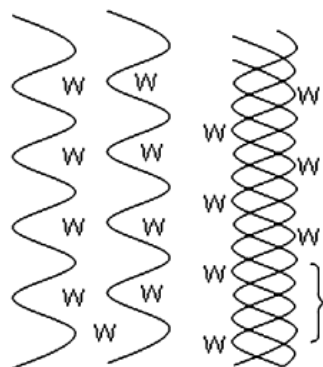


Figura 1.4: Representação esquemática da conformação das curdlanas à temperatura ambiente (McIntosh *et al.* 2005).

Estas glucanas pertencem à família restrita de polissacarídeos bacterianos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) como aditivos alimentares. As curdlanas têm sido usadas na área alimentar essencialmente como aditivos para melhorar a textura e como estabilizantes (Grandpierre *et al.* 2008). Para além da área alimentar, as curdlanas e outras $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-glucanas}$ têm potencial farmacológico. Estes polissacarídeos são membros de uma classe de compostos conhecidos por modificadores da resposta biológica que aumentam ou restauram deficiências imunitárias. Deste modo, podem apresentar actividade anti-tumoral, anti-microbiana, anti-inflamatória, anti-coagulante e podem também exercer um efeito protector contra a radiação. Estas propriedades dependem da estrutura química, massa molecular e conformação da glucana. Estudos indicam que a conformação em tripla hélice é aquela que favorece as propriedades imuno-moduladoras (McIntosh *et al.* 2005). Muitas das $\beta\text{-glucanas}$ produzidas por fungos (lentinana e escleroglucana) adoptam também uma conformação em tripla hélice (Zhang *et al.* 2006; Chen e Seviour 2007). As $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-glucanas}$ caracterizam-se por possuírem uma conformação flexível em hélice. As $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-glucanas}$ são flexíveis, uma vez que não possuem uma conformação específica (Zhang *et al.* 2006).

1.2.3. Polissacarídeos produzidos por *T. versicolor*

a) Produção e Extração

As estirpes mais conhecidas e estudadas de *T. versicolor* são as estirpes CM-101 e Cov-1. São estas as responsáveis pela produção de dois polissacarídeos, PSK (polissacaropeptídeo Krestin) e PSP (polissacaropeptídeo), respectivamente. No entanto, existem outras estirpes de *T. versicolor* capazes de produzirem EPS com actividade biológica. Estes biopolímeros podem ser obtidos pela cultura de *T. versicolor* em substrato sólido ou em meio líquido (fermentação submersa). A fermentação em meio líquido é a mais usual, sendo a usada em formulações clinicamente aprovadas (Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008).

Nos meios líquidos a glucose é a fonte de carbono mais usual. A peptona, extracto de levedura e as farinhas de soja ou amendoim são as fontes de azoto utilizadas (Cui e Chisti 2003). A fermentação decorre entre os 24 °C e os 28 °C sob condições aeróbias. O pH geralmente não é controlado e situa-se entre 5,0 e 7,0 (Ng 1998; Cui e Chisti 2003). Tavares *et al.* (2005) optimizou a produção de polissacarídeo por *T. versicolor*, usando o meio YM (yeast medium) com 13,8 g/L de glucose a um pH de 5,5. Neste tipo de culturas o micélio de *T. versicolor* pode desenvolver-se sob a forma de agregados ou como um micélio disperso. A razão pela qual a morfologia deste fungo difere é ainda desconhecida (Cui e Chisti 2003).

Na natureza, o *T. versicolor* desenvolve-se em substratos sólidos (troncos de árvores). Contudo, este tipo de fermentação é pouco utilizada, devido ao difícil controlo das condições de fermentação e à propensão para o aparecimento de contaminações. As palhas e o farelo de trigo foram substratos já usados neste tipo de culturas. Apesar de já estarem disponíveis métodos para efectuar fermentações controladas em substratos sólidos, a fermentação em meio líquido continua a ser a mais usada (Cui e Chisti 2003).

Na extração destes polissacarídeos podem ser usados diferentes métodos. A extração com água quente (98 °C) é usada para extrair os polissacarídeos da biomassa em quantidades suficientes para fins comerciais. São feitas diversas extracções com água quente e os diferentes extractos são concentrados. É a partir deste concentrado que os polissacarídeos são precipitados com sulfato de amónia ou com um álcool (Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008). O precipitado é separado, redissolvido em água e

pode posteriormente ser purificado por métodos cromatográficos (Cui e Chisti 2003; Barbosa *et al.* 2004; Cheng e Leung 2008). A cromatografia de exclusão molecular é o método mais usado na purificação do EPS (Cui e Chisti 2003).

Os polissacarídeos podem também ser recuperados a partir do meio de cultura através de centrifugação, filtração e adição de agentes precipitantes de polissacarídeos, diálise e liofilização. A centrifugação é utilizada para sedimentar as células, separando-as dos polissacarídeos solúveis no meio extracelular. O etanol é o agente precipitante mais comum, embora possam ser utilizados outros precipitantes como o isopropanol (Zhang *et al.* 2006). A relação entre o volume de etanol e o volume de sobrenadante do meio de cultivo mais usada tem sido 4:1 (Tavares *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2006; Cui *et al.* 2007).

b) Características químicas e fisiológicas

O PSP e o PSK apresentam uma cor castanha, são solúveis em água (Cui e Chisti 2003; Jeong *et al.* 2004; Cui *et al.* 2007; Cheng e Leung 2008; Rau *et al.* 2009) e insolúveis em solventes orgânicos como o metanol, piridina, clorofórmio, benzeno e hexano (Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008). O peso molecular é idêntico em ambos os casos, sendo aproximadamente 100 kDa. Apesar do PSP e PSK apresentarem actividades fisiológicas idênticas, têm diferenças a nível de composição química (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008).

Ambos têm como cadeia principal uma glucana contendo por isso elevadas quantidades de glucose (80-94%). Podem-se ainda encontrar galactose, manose e xilose (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008; Lin *et al.* 2008; Rau *et al.* 2009). A principal diferença entre estes polissacarídeos, reside na presença de fucose e ausência de arabinose e ramnose no caso de PSK (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008; Rau *et al.* 2009). Estes polissacarídeos possuem também uma parte proteica (4-38%) essencialmente constituída por aminoácidos neutros como a treonina, a serina, a glicina, a alanina, a valina e a leucina e aminoácidos ácidos (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008).

Os resíduos de glucose encontram-se, tanto no PSP como no PSK, unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow3)$, para o caso do PSP (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Jeong *et al.* 2004; Cheng e Leung 2008; Lin *et al.* 2008; Rau *et al.* 2009). Esta β -glucana contém

também resíduos de glucose ligados em $\beta(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$ à cadeia principal (Ng 1998; Jeong *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006; Cui *et al.* 2007; Cheng e Leung 2008; Rau *et al.* 2009). Ng (1998) refere ainda a existência de ligações $(1\rightarrow3)$, $(1\rightarrow4)$ e $(1\rightarrow6)$ entre resíduos de galactose, $(1\rightarrow3)$ e $(1\rightarrow6)$ na manose e $(1\rightarrow3)$ e $(1\rightarrow4)$ na arabinose, no caso do PSP.

A estes polissacarídeos são atribuídas diversas actividades biológicas, incluindo actividade imuno-moduladora, anti-tumoral, anti-microbiana e melhoria das funções hepáticas (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Zhou *et al.* 2007; Cheng e Leung 2008). Estudos indicam que a actividade anti-tumoral pode ser mediada pela actividade imuno-moduladora e não por citotoxicidade directa sobre as células cancerígenas, como acontece na maioria dos medicamentos usados. O PSP e PSK inibem a proliferação de linhas celulares cancerígenas de leucemia, linfoma, hepatoma e cancro da mama e pulmão (Ho *et al.* 2004; Cheng e Leung 2008). O mecanismo básico de inibição das células cancerígenas inclui a activação de macrófagos, células NK (linfócitos citotóxicos) e das células Th (linfócitos T-reguladores) que induzem a produção de células Tk (linfócitos T-citotóxicos), anticorpos e interleucinas (Cheng e Leung 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que a actividade anti-tumoral de PSP e PSK é dependente do tumor e da concentração administrada (Ho *et al.* 2004; Chan e Yeung 2006; Zhou *et al.* 2007; Cheng e Leung 2008).

Para além destes efeitos anti-tumorais, o PSK demonstrou ter actividade anti-viral contra infecções provocadas pelo vírus ectromelia, citomegalovírus e contra o vírus da imunodeficiência humana (VIH). Estudos preliminares indicam que o PSP será útil no combate às hepatites e na protecção do fígado contra compostos hepato-tóxicos (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008).

Estes polissacarídeos foram já sujeitos a ensaios clínicos como adjuvantes terapêuticos nos tratamentos de diversos cancros. A administração de PSP a doentes sujeitos a tratamentos de quimioterapia e radioterapia, melhorou a sua qualidade de vida e reduziu os efeitos secundários dos tratamentos (fraqueza, falta de apetite, dores, entre outros). O PSK, usado em ensaios clínicos no Japão, estendeu em cinco anos a taxa de sobrevivência em pacientes diagnosticados com cancro no estômago, esófago, mama, pulmão, colo-rectal e nasofaríngeo (Cui e Chisti 2003; Chan e Yeung 2006; Cheng e Leung 2008).

Cui *et al.* (2007) demonstrou que os EPS produzidos por *Trametes versicolor* Wr-74 e ATCC-20545 apresentam actividade biológica. Estes EPS são constituídos

essencialmente por glucose (94% e 86% respectivamente). Contêm também uma pequena parte proteica (2% e 4% respectivamente) constituída principalmente por aminoácidos ácidos e neutros (Cui *et al.* 2007). Rau *et al.* (2009) estudou o polissacarídeo produzido pela estirpe ATCC 200801 de *T. versicolor*. Este é constituído por glucose em ligação $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$. Contém também uma parte proteica (2-3,6%) (Rau *et al.* 2009). Lin *et al.* (2008) usou a estirpe LH1 para produzir um EPS com 82 % de glucose em ligação $\beta(1\rightarrow3)$ com actividade imunomoduladora.

Em Portugal foi já feito um estudo durante um ano com um grupo de mulheres acompanhadas no IPO de Coimbra que sofriam de cancro do colo do útero. O estudo revelou que 72,5% das pacientes apresentavam citologia cervical normal após um ano de tratamento com extractos deste fungo e sem os tratamentos cirúrgicos habituais (Moura e Ferreira 2008). Os extractos deste fungo podem também já ser adquiridos em farmácias e parafarmácias portuguesas (Moura e Ferreira 2008).

1.3. Análise de Polissacarídeos

1.3.1. Hidrólise

Para analisar a estrutura de um polissacarídeo é necessário, em primeiro lugar, determinar os resíduos monossacarídicos que o constituem (Barbosa *et al.* 2004; Nelson e Cox 2004; Silva *et al.* 2005). As ligações glicosídicas que unem os monossacarídeos são formadas quando um grupo hidroxilo de um dos açúcares reage com o carbono anomérico do outro açúcar. Esta reacção representa a formação de um acetal a partir de um hemiacetal e um álcool. As ligações glicosídicas podem ser facilmente hidrolisadas por reacções catalizadas por ácidos mas resistem à clivagem por bases. A hidrólise, quando completa, dará origem aos monossacarídeos que constituem os polímeros, como se observa na Figura 1.5 (Nelson e Cox 2004; Carey 2006).

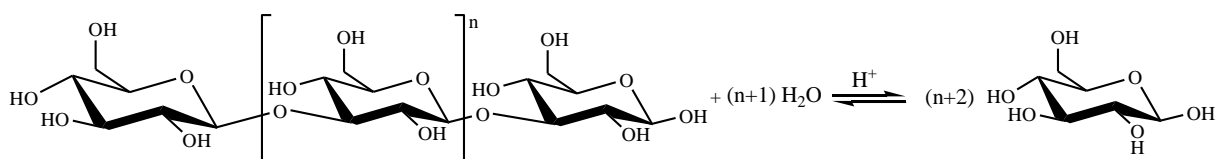


Figura 1.5: Hidrólise da ligações glicosídicas de uma (1 \rightarrow 3)- β -glucana em meio ácido, originando a sua unidade monomérica a β -D-glucose (Carey 2006).

Os polímeros possuem velocidades de hidrólise diferentes, que variam de acordo com o tamanho do anel hemiacetal, a conformação dos monossacarídeos, configuração anomérica e natureza das ligações glicosídicas, presença de grupos funcionais na molécula, intensidade das interações intra e intermoleculares, entre outras (Belitz e Grosch 1987; Berg *et al.* 2002). Grandpierre *et al.* (2008) demonstraram que apenas 25% da curdlana é hidrolisada usando H_2SO_4 1M, mesmo após 90 h. No entanto, quando é utilizado um extracto enzimático do fungo *Trichoderma harzianum* (β -glucanases) após as 90 h a hidrólise é completa. Esta resistência à hidrólise deve-se às conformações em tripla hélice que este tipo de polissacarídeo pode apresentar, dificultando o acesso do ácido ao interior da hélice (Grandpierre *et al.* 2008).

1.3.2. Derivatização

a) Identificação de monossacarídeos

A cromatografia é a técnica mais usada para separar os monossacarídeos de uma mistura. De entre as diferentes técnicas a mais usada é a cromatografia em fase gasosa. Para serem analisados deste modo, os monossacarídeos necessitam de ser convertidos a derivados voláteis (Berg *et al.* 2002; Nelson e Cox 2004).

O primeiro passo da derivatização é a redução dos monossacarídeos a alditóis. Nesta reacção o grupo carbonilo dos açúcares é reduzido a uma função álcool. Deste modo formam-se os alditóis, os quais são os derivados totalmente hidroxilados dos açúcares iniciais (Figura 1.6). A redução pode ser alcançada por hidrogenação catalítica ou utilizando boro-hidreto de sódio (Selvendran *et al.* 1979; Coimbra *et al.* 1994).

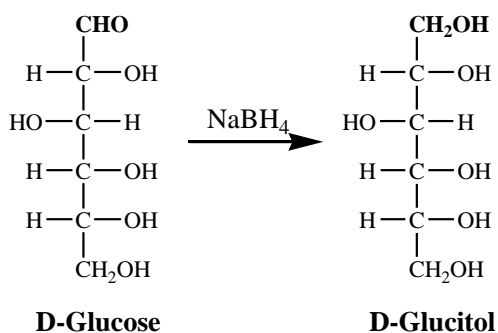


Figura 1.6: Redução da glucose a glucitol, por acção do boro-hidreto de sódio (Halpern 1997).

O segundo e último passo, consiste na transformação dos alditóis a acetatos de alditol. Quando os açúcares reagem com haletos de acilo ou com anidridos ácidos formam-se ésteres, o mesmo acontece no caso dos alditóis (Figura 1.7) (Selvendran *et al.* 1979; Belitz e Grosch 1987; Coimbra *et al.* 1994; Carey 2006). Para catalizar esta reacção é normalmente usado o 1-metilimidazole (Coimbra *et al.* 1994). Estes derivados são voláteis logo podem ser analisados por cromatografia em fase gasosa. O detector usado é o FID (flame ionization detector), ou detector de ionização de chama, os tempos de retenção são comparados com padrões previamente conhecidos e os compostos são identificados (Selvendran *et al.* 1979; Coimbra *et al.* 1994; Sasaki *et al.* 2008).

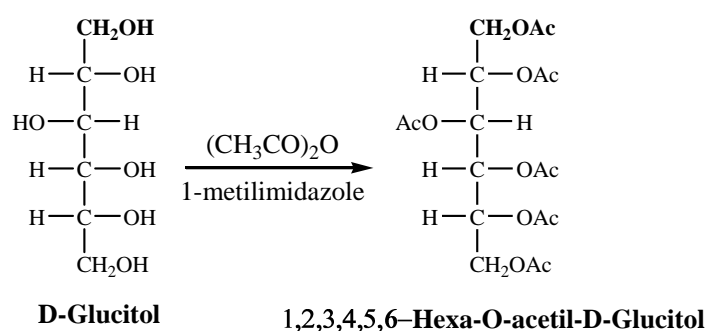


Figura 1.7: Reacção de esterificação do D-glucitol pelo anidrido acético (Carey 2006).

b) Identificação das ligações glicosídicas

A análise por metilação é uma das técnicas mais comuns na caracterização de polissacarídeos, sendo usada para estabelecer a posição da ligação e o tipo de anel dos monossacarídeos que constituem a amostra. Esta técnica envolve a metilação de todos os grupos hidroxilo livres dos açúcares que constituem o polissacarídeo, de seguida a hidrólise do polissacarídeo e a análise dos derivados parcialmente metilados (Haworth 1915; Ciucanu e Kerek 1984; Nelson e Cox 2004; Zhang *et al.* 2006). Um dos reagentes alquilantes usados é o iodeto de metilo que origina éteres de açúcares por alquilação (Figura 1.8) (Haworth 1915; Ciucanu e Kerek 1984; Belitz e Grosch 1987; Nelson e Cox 2004; Carey 2006). Após a metilação dos grupos hidroxilo o polímero é sujeito a uma hidrólise ácida. Nestas condições apenas o grupo metoxi anomérico é hidrolisado (Carey 2006).

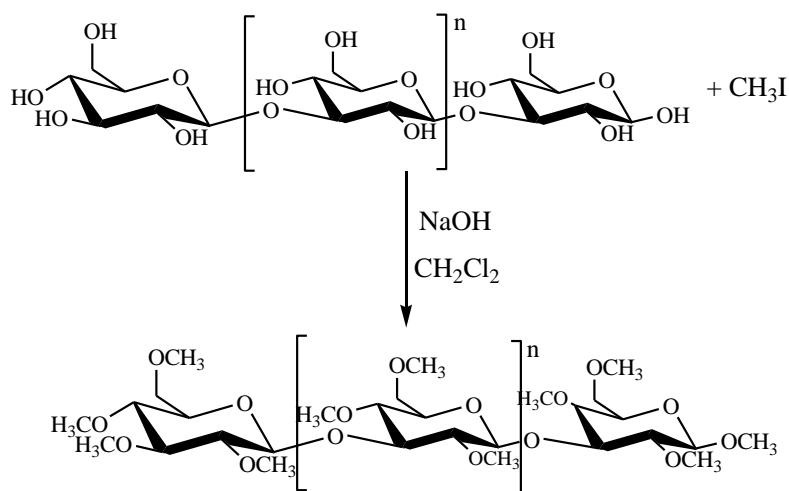


Figura 1.8: Reacção de metilação de uma β -glucana pelo iodeto de metilo (Carey 2006).

Embora a metilação seja considerada um dos principais métodos para estudar a estrutura dos polissacarídeos, não é capaz de proporcionar a informação adequada a respeito da configuração anomérica e do arranjo espacial dos vários resíduos de açúcar. A ressonância magnética nuclear tem sido utilizada, com sucesso, na determinação da estrutura de polissacarídeos. Esta técnica baseia-se na absorção de energia em frequências características quando colocados num campo magnético forte de núcleos magnéticos tais como ^1H , ^{13}C , ^{31}P e ^{15}N . A frequência de ressonância de determinado núcleo, expressa como um desvio químico (δ), é sensível ao ambiente químico da molécula, tornando o RMN uma técnica valiosa para estudos estruturais. Cada molécula tem um espectro de RMN característico que pode ser usado como uma impressão digital ("fingerprint") da mesma. Uma outra grande vantagem desta técnica é o seu carácter não destrutivo, tornando-a uma das primeiras técnicas escolhidas para caracterização estrutural (Grivet *et al.* 2003; Nelson e Cox 2004; Zhang *et al.* 2006).

1.4. Objectivos

Os fungos são conhecidos pelo seu valor nutricional e medicinal, apesar dos mecanismos por detrás destas actividades não serem completamente conhecidos. Durante as últimas décadas são vários os países envolvidos em pesquisa com polissacarídeos produzidos pelo fungo *Trametes versicolor*, desde o Japão, China, Korea e mais recentemente os EUA (Estados Unidos da América) (Cui *et al.* 2007). No entanto, a maioria destes estudos é efectuada com os polissacarídeos extraídos dos corpos frutíferos do fungo. Assim, este trabalho pretende produzir e analisar

quimicamente o EPS excretado pelo fungo *T. versicolor* durante a sua cultura em meio líquido. Deste modo, este trabalho teve como principais objectivos:

- ✓ Produzir polissacarídeo a partir de culturas líquidas do fungo *Trametes versicolor*;
- ✓ Isolar os polissacarídeos usando diferentes métodos;
- ✓ Solubilizar o polissacarídeo isolado em água e posteriormente em soluções alcalinas;
- ✓ Caracterizar quimicamente o polissacarídeo isolado por análise dos monossacarídeos e das ligações glicosídicas que o constituem.

2. METODOLOGIAS

2.1. Origem das fracções analisadas

O *Trametes versicolor* (fornecido pelo INETI) foi cultivado em meio sólido e posteriormente transferido para uma cultura líquida. A separação da biomassa foi feita por centrifugação e o exopolissacarídeo foi precipitado com etanol a 80%. Após a remoção do etanol, sem deixar que o polímero secasse, verificou-se que o material precipitado em etanol deixou de ser solúvel em água fria. Numa tentativa de o solubilizar, a suspensão foi aquecida a 80°C durante 10 min e centrifugada. Daqui resultou um precipitado (EPS_IQ) e um sobrenadante (EPS_SQ). Foi também testada a solubilidade em soluções de NaOH do EPS extraído com etanol. Daqui resultou, um precipitado (EPS_AI_I) e um sobrenadante (EPS_AI_S).

Como o EPS produzido por este fungo é solúvel no meio de cultura mas torna-se insolúvel em água após a precipitação com etanol, tentou-se recolher o EPS por evaporação da água do meio. À medida que o meio foi concentrado, foram obtidos três precipitados (PP_1, PP_2 e PP_3) e o resíduo final do meio (Sb_4). Estas amostras foram dialisadas e centrifugadas, obtendo-se os respectivos sobrenadantes dos precipitados obtidos anteriormente (Sb_1, Sb_2 e Sb_3) e ainda um precipitado proveniente do resíduo final da evaporação (PP_4). Deste modo, foram obtidos quatro precipitados e 4 sobrenadantes, como se observa na Figura 2.1.

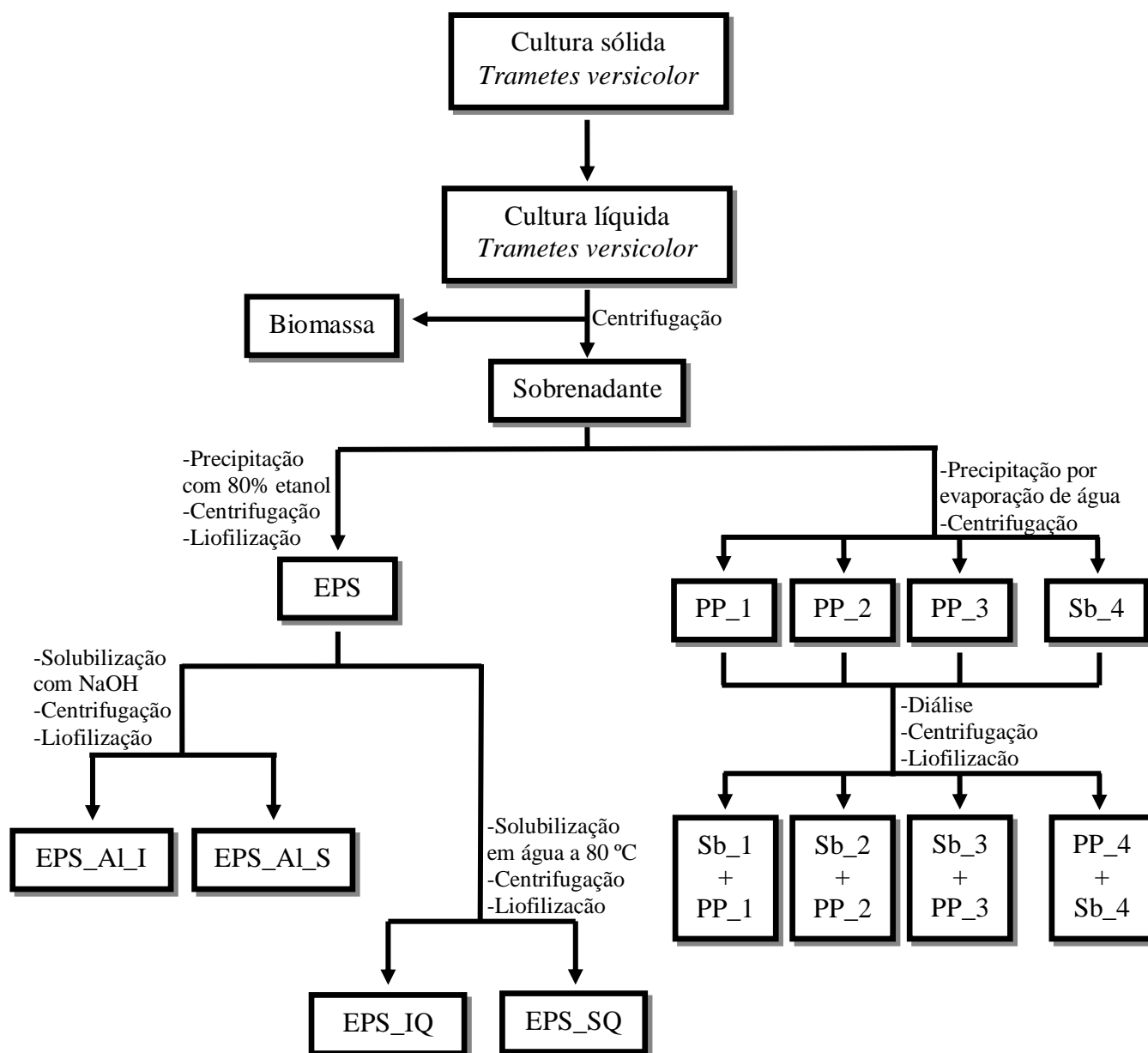


Figura 2.1: Diagrama resumo sobre a origem das fracções analisadas.

2.2. Esterilização de Material

O material necessário directa ou indirectamente ao crescimento do fungo foi devidamente esterilizado em autoclave durante 22 minutos a 120 °C (Tavares *et al.* 2005). A manipulação do fungo foi realizada à chama, numa câmara de fluxo laminar com ligação prévia de radiação ultravioleta e com todos os cuidados necessários para manter a esterilidade.

2.3. Cultura dos fungos

2.3.1. Cultura em placas de Petri

O meio sólido Tien & Kirk (Tak) (Tavares *et al.* 2005) foi usado na cultura em placas de Petri. A composição do meio encontra-se presente na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição do meio Tien & Kirk (Tak) usado para cultura do fungo *T. versicolor* (Tavares *et al.* 2005).

Componentes	m (g/L)
Glucose	10,0
Extracto de Malte	10,0
Extracto de Levedura	2,00
Peptona	2,00
Asparagina	1,00
Tiamina	0,001
KH ₂ PO ₄	2,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00
Agár	20,0

O meio de cultura foi aquecido num microondas e colocado nas placas de Petri a arrefecer. Usou-se uma espátula para cortar pequenos pedaços de meio com o fungo de placas anteriormente preparadas e colocou-se no centro das novas placas. As novas placas foram incubadas a 28 °C (Tavares *et al.* 2005). Após o crescimento do fungo durante 7 dias, as placas foram seladas com Parafilm® e armazenadas a 4 °C.

2.3.2. Cultura em meio líquido

Com as devidas precauções no que diz respeito à esterilidade, colocou-se com uma pipeta, 12,00 mL de meio Yeast Medium (Tabela 2.2) em cada placa cheia de fungo. De seguida, com a ajuda da ansa, raspou-se cuidadosamente o micélio do fungo de modo a não retirar agár (para não influenciar na determinação de biomassa). Depois esvaziou-se a suspensão de fungo de cada placa para um Erlenmeyer previamente esterilizado onde se depositou toda a suspensão de inóculo (Tavares *et al.* 2005). Após a

Metodologias

determinação da biomassa fúngica (ponto 2.6.1), a suspensão de fungo foi igualmente distribuída por Erlenmeyeres com 250 mL de meio YM. O crescimento foi efectuado numa incubadora a 28°C com agitação (180 r.p.m) durante sete dias (Tavares *et al.* 2005).

Tabela 2.2: Composição do meio Yeast Medium (YM) usado para cultura do fungo *T. versicolor* (Tavares et al. 2005).

Componentes	m (g/L)
Glucose	13,8
Extracto de Malte	3,00
Extracto de Levedura	5,00
Peptona	5,00

2.4. Extracção do exopolissacarídeo

2.4.1. Separação da biomassa fúngica

Cada um dos Erlenmeyeres com cultura líquida foi tratado como uma amostra diferente. Para isolar o exopolissacarídeo do meio fermentado foi usada uma centrífuga (Sigma 3K30) operada a 11.700×g a 4 °C durante 20 min (Tavares *et al.* 2005). O volume de sobrenadante obtido foi medido com uma proveta e colocado num Erlenmeyer.

2.4.2. Precipitação em Etanol

A cada sobrenadante obtido foi adicionado quatro vezes o seu volume em etanol a 96%, perfazendo 80% (v/v), lentamente e com agitação (Tavares *et al.* 2005). A solução ficou em repouso durante a noite a -20 °C. O precipitado obtido foi centrifugado nas condições referidas anteriormente e o sobrenadante foi guardado.

2.4.3. Precipitação por evaporação de água

Os sobrenadantes resultantes da separação da biomassa fúngica foram submetidos a uma temperatura de 90 °C durante 10 min. O precipitado obtido foi

separado do sobrenadante por centrifugação nas condições anteriormente referidas. Este sobrenadante foi concentrado num evaporador rotativo a 40 °C até se atingir ¼ do seu volume inicial. Sempre que se verificou um precipitado a evaporação foi parada e o precipitado novamente separado por centrifugação. O sobrenadante resultante era novamente concentrado.

2.5. Solubilização do EPS

2.5.1. Água

Após a precipitação do EPS em etanol, adicionou-se 100,0 mL de água destilada à temperatura ambiente. Usando um evaporador rotativo, evaporou-se o etanol residual a 40 °C sem deixar secar o polímero. Centrifugou-se a suspensão e adicionou-se à fracção retida 100,0 mL de água a 80 °C, mantendo-se a esta temperatura durante 10 min. A mistura foi novamente centrifugada. A fracção não solúvel foi congelada e liofilizada. A fracção solúvel foi concentrada num evaporador rotativo, congelada e liofilizada.

2.5.2. Solução de NaOH

As amostras de EPS liofilizado, provenientes da fracção não solúvel a 80 °C, foram solubilizadas em soluções de NaOH com diferentes concentrações (0,4, 1,0, e 4,0 M). Utilizaram-se também várias concentrações de EPS: 1,0, 2,0 e 5,0 mg/mL. Após três horas de agitação, a suspensão foi centrifugada. O precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado mais uma vez, congelado e liofilizado. O sobrenadante foi neutralizado até pH 5.5 usando ácido acético glacial e guardado a -20° C.

2.6. Quantificação da biomassa seca

2.6.1. Secagem rápida da biomassa por Infravermelho

A secagem da biomassa por infravermelho foi efectuada para quantificar a biomassa seca numa amostra do inóculo do fungo para assim determinar a quantidade

de biomassa fúngica a colocar em cada Erlenmeyer, de modo a obter-se a concentração de 70 mg/mL de fungo no início das fermentações líquidas. Filtrou-se, com o auxílio de uma bomba de vácuo, a amostra (8,00 mL) usando filtros com poro de 1 μ m. Estes filtros e as caixas de Petri que os suportavam foram previamente pesados. Colocaram-se os filtros sob uma lâmpada de infravermelho durante pelo menos 2 horas. De seguida foram arrefecidos num exsiccador. Pesaram-se os filtros até que atingisse peso constante e efectuaram-se os cálculos necessários (Tavares *et al.* 2005).

2.6.2. Quantificação da biomassa por peso seco

A concentração de biomassa foi determinada pelo peso seco do micélio. O meio de cultura foi centrifugado (Sigma 3K30) nas condições referidas anteriormente. O micélio foi lavado com água destilada a 50 °C sob constante agitação e centrifugado novamente nas mesmas condições. A biomassa resultante foi seca a 100 °C numa estufa até peso constante (Tavares *et al.* 2005).

2.7. Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-300 HR

A fracção extraída com NaOH e neutralizada com ácido acético foi analisada por cromatografia de exclusão molecular. Neste tipo de cromatografia os diferentes componentes de uma amostra são separados de acordo com a sua massa molecular. A cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-300 HR foi realizada numa coluna Pharmacia XK 26/80 com diâmetro de 2,6 cm e 45 cm de altura de fase estacionária. A coluna foi empacotada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Usou-se como eluente uma solução tampão de fosfato de sódio 100 mM a pH 6,5 com ureia 3 M e 0,02% de azida de sódio, com um fluxo de 0,5 mL/min. O material analisado foi dissolvido num volume de 1,5 mL e aplicado no topo da coluna através de uma bomba peristáltica. Fracções de 2 mL foram recolhidas e analisadas para a presença de açúcares totais (ponto 2.8.1) e de sais por condutividade. A calibração da coluna foi efectuada usando a dextrana azul e a glucose para determinar os volumes de exclusão e inclusão respectivamente e dextranas de 150 kDa e 25 kDa. Foram recolhidas fracções de 2 mL que posteriormente foram analisadas para a identificação dos açúcares totais.

2.8. Análise de Açúcares

2.8.1. Determinação colorimétrica de açúcares totais (fenol-ácido sulfúrico)

O método colorimétrico proposto por Dubois *et al.* (1956) foi usado para analisar a presença dos açúcares totais existente nas diversas fracções recolhidas da cromatografia em coluna.

Os ácidos fortes a temperaturas elevadas levam à desidratação dos açúcares. As pentoses originam o furfural e as hexoses o 5-hidroximetilfurfural. Estes compostos, na presença de fenol, originam cromóforos de cor laranja, cuja intensidade é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra.

Retiraram-se 40 µL de amostra para tubos de ensaio. À amostra foi adicionado 160 µL de uma solução de fenol a 5%. Após agitação, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e agitou-se novamente. Os tubos foram depois colocados num banho de água a 100 °C por 10 min, para o desenvolvimento da cor. Após o aquecimento, foram deixados a arrefecer no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente foi medida a absorvância a 490 nm.

2.8.2. Identificação e quantificação de açúcares neutros

A análise de açúcares foi efectuada após a hidrólise com ácido sulfúrico do material polissacarídico, seguindo-se a derivatização dos açúcares libertados a acetatos de alditol por adaptação do método proposto por Coimbra *et al.* (1994).

Foram pesados rigorosamente entre 2 a 3 mg de amostra liofilizada em tubos de cultura. Adicionou-se 200 µL de ácido sulfúrico 72% (p/p). Deixou-se a reagir durante 3 horas à temperatura ambiente com agitação ocasional. De seguida a amostra foi diluída com 2,2 mL de água destilada (H₂SO₄ 1 M) e incubada a 100 °C durante 2,5 horas. Sempre que se analisavam os ácidos urónicos pelo método colorimétrico (ponto 2.8.3), ao fim de 1 hora foram retirados 500 µL e guardados para posterior análise.

Foi também efectuada uma segunda hidrólise à fracção EPS_IQ usando H₂SO₄ 2 M. Neste caso adicionou-se à amostra, 400 µL de H₂SO₄ 72% e deixou-se reagir durante 3 horas à temperatura ambiente. A amostra foi diluída com 2,2 mL de água destilada, e esta foi incubada a 110 °C durante 1 hora.

Após o arrefecimento à temperatura ambiente adicionaram-se 200 µL do padrão interno, a 2-desoxiglucose (1 mg/mL). A 1,00 mL da solução obtida foram adicionados 200 µL de solução de NH₃ 25%, para neutralização, e 100 µL de uma solução contendo 15% de NaBH₄ (boro-hidreto de sódio) em NH₃ 3 M para redução dos açúcares a alditóis. A solução foi agitada e incubada a 30 °C por uma hora. No fim colocaram-se os tubos em gelo e 50 µL de ácido acético glacial foram adicionados por duas vezes, para eliminação do excesso de NaBH₄.

A metodologia de derivatização dos alditóis a acetatos de alditol foi adaptada do descrito por Blakeney *et al.*(1983). Retiraram-se 300 µL da solução e adicionaram-se 450 µL de 1-metilimidazole e 3,0 mL de anidrido acético. De seguida os tubos foram arrefecidos em gelo, agitados no vortex e incubados a 30 °C durante 30 minutos.

O excesso de anidrido acético foi destruído por adição de 2,5 mL de água destilada e os acetatos de alditol extraídos por adição de 2,5 mL de diclorometano. Os tubos foram agitados vigorosamente e de seguida centrifugados a 1000 r.p.m. durante 1 min para a separação das fases. Posteriormente aspirou-se a fase aquosa e adicionaram-se mais 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano repetindo-se os passos de agitação, centrifugação e aspiração. Estes passos foram repetidos por mais duas vezes adicionando apenas água destilada, como o objectivo de remover completamente o 1-metilimidazole.

A fase orgânica foi evaporada por centrifugação a vácuo. Adicionou-se 1 mL de acetona anidra e centrifugou-se novamente para eliminar qualquer resíduo de água. Efectuou-se este passo por mais 2 vezes. Por fim, o precipitado obtido foi dissolvido em 50 µL de acetona anidra e analisado por cromatografia em fase gasosa (GC).

Os acetatos de alditol resultantes foram separados, identificados e quantificados por GC (Perkin Elmer – Clarus 400), injectando um volume de 2 µL. Foi usada uma coluna polar intermédia (DB-225) com um comprimento de 30 m, diâmetro de 0,25 mm e espessura de filme de 0,15 µm, com uma velocidade do gás de arraste (H₂) de 1 mL/min. O programa de temperaturas do forno usado foi: temperatura inicial de 200 °C, aumento de temperatura de 40 °C/min até 220 °C, a 220 °C durante 14 min seguindo-se um aumento de 20 °C/min até os 230 °C, mantendo esta temperatura por 1 min. A detecção foi efectuada utilizando um detector de ionização de chama (FID). A temperatura do injectador foi de 220 °C e no detector 230 °C.

A quantificação dos acetatos de alditol nas amostras foi efectuada pela técnica do padrão interno. As amostras foram analisadas em duplicado.

2.8.3. Quantificação dos ácidos urónicos pelo método colorimétrico

A quantificação dos ácidos urónicos pelo método colorimétrico foi efectuada segundo o método descrito por Selvendran *et al.* (1979).

Após a hidrólise com ácido sulfúrico 1 M (ponto 2.8.2) durante 1 hora a 100 °C retiraram-se 500 µL e adicionaram-se 3,0 mL de água destilada. Transferiram-se 500 µL para tubos de ensaio. Estes foram colocados num banho de gelo. Adicionaram-se 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado contendo 50 mM de ácido bórico. Após agitação, os tubos foram colocados num banho de água a 100 °C durante 10 minutos. Depois de arrefecidos em gelo, a dois dos três tubos que continham amostra, foram adicionados 100 µL de m-fenilfenol 0,15% em NaOH 0,5%, ao terceiro tubo não é adicionado o reagente pois este funcionará como branco. Os tubos foram deixados em repouso no escuro por 30 minutos para o desenvolvimento da cor e a absorvância foi lida a 520 nm para as amostras e branco. Por cada determinação de ácidos urónicos efectuada, foi necessário efectuar a respectiva recta de calibração utilizando como padrão ácido glucurónico (200 µg/mL) por interpolação na gama de concentrações entre 0 e 100 µg/mL.

2.8.4. Ácidos Urónicos - HPLC

Foi pesada rigorosamente 1 mg de amostra para tubos de cultura. Hidrolisou-se a amostra com 1 mL de TFA (ácido trifluoracético) 2 M durante 1 hora a 120 °C. Ao fim deste período, o ácido foi evaporado por centrifugação a vácuo. A amostra foi dissolvida em 300 µL de H₂O.

Na análise dos ácidos urónicos foi usada a coluna Rezex RCM-Monosaccharide com 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro à temperatura de 80 °C, ligada a uma bomba Hitachi L-6200A e um integrador HP 3394A. A água destilada foi o eluente usado com um fluxo de 0,15 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. Os ácidos urónicos foram detectados usando um detector ELSD (“evaporative light scattering detection”) a uma temperatura de 51 °C e com uma pressão de azoto de 1,9 bar.

Foram injectados padrões de ácido glucurónico e galacturónico, glucose, galactose e manose (1 mg/mL) para determinar os respectivos tempos de retenção para posterior comparação com os da amostra.

2.9. Análise das ligações glicosídicas

2.9.1. Metilação

A análise de metilação foi realizada para determinar as ligações glicosídicas existentes entre os açúcares componentes das fracções obtidas.

Foram pesados 2 mg de amostra liofilizada para tubos de cultura e adicionou-se 1,00 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), deixando-se a agitar durante 12 horas. No fim da agitação foram adicionadas 2 a 3 espátulas de NaOH em pó, triturado na hora sob atmosfera de argon, e deixou-se a agitar por 30 min. De seguida, adicionou-se 1 mL de iodeto de metilo e deixou-se a agitar durante 2,5 horas. Posteriormente foram adicionados 3,0 mL de água destilada e 3,0 mL de diclorometano. Os tubos foram agitados vigorosamente, centrifugados a 4000 r.p.m. durante 1 min e a fase aquosa foi aspirada. Adicionaram-se mais 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano e os passos de agitação, centrifugação e aspiração foram efectuados novamente. Estes passos foram repetidos, apenas com adição de água, até limpar o resíduo existente na interface. O diclorometano foi evaporado por centrifugação a vácuo, durante 30 min. Este procedimento foi repetido de modo a promover-se uma remetilação.

2.9.2. Hidrólise e derivatização dos açúcares parcialmente metilados a acetatos de alditol parcialmente metilados

Após a nova metilação, adicionaram-se 0,5 mL de TFA 2 M e deixou-se a incubar durante 1 h a 121 °C. De seguida, o ácido foi evaporado por centrifugação a vácuo. Após a secagem foram adicionados 300 µL de NH₃ 2 M e 20 mg NaBD₄ (boro-hidreto de sódio deuterado) e incubou-se a 30 °C por 1 h. No fim colocou-se os tubos em gelo e adicionou-se 50 µL de ácido acético glacial por duas vezes. Depois foram adicionados 450 µL de 1-metilimidazole e 3 mL de anidrido acético, agitou-se no vortex e incubou-se a 30 °C por 30 min. Por fim, adicionaram-se 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano e agitou-se vigorosamente. A suspensão foi centrifugada e a fase aquosa aspirada. Adicionaram-se novamente 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano repetindo os passos de agitação e aspiração. O passo anterior foi repetido por mais duas vezes adicionando apenas água destilada. De seguida o diclorometano foi

evaporado por centrifugação a vácuo. Posteriormente adicionou-se 1 mL de acetona anidra, que foi evaporada nas mesmas condições. Este passo foi repetido por mais uma vez.

Os acetatos de alditol parcialmente metilados foram dissolvidos em 50 μ L de acetona anidra e identificados por GC-MS (Agilent Technologies G890N Network), injectando um volume de 0,2 μ L. Foi usada uma coluna capilar (0,23 mm) apolar (DB1) com 30 m e 0,2 μ m de espessura de filme. O programa de temperaturas do forno usado foi: temperatura inicial de 45 °C, aumento de temperatura de 10 °C/min até 140 °C, a 140 °C durante 5 min seguindo-se um aumento de 0,5 °C/min até os 170 °C, mantendo esta temperatura por 1 min e por fim seguiu-se um aumento de 15 °C/min até aos 280 °C, mantendo esta temperatura por 5 min. A identificação foi efectuada por comparação dos tempos de retenção relativos e espectros de massa com os publicados.

2.10. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A fracção do sobrenadante obtida na extracção por evaporação de água foi analisada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Esta técnica permite a obtenção de informação estrutural (tipo de ligação glicosídica e conformação dos carbonos anoméricos). A amostra liofilizada (5 mg) foi diluída em 1 mL de D₂O (água deuterada). O espectro de ressonância magnética nuclear heteronuclear de detecção inversa (HSQC, ¹H/¹³C) foi registado num espectrómetro Bruker DRX 500 (293 K a 500 MHz e SR de 12 kHz), usando como referência o TSP-d4.

2.11. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma metodologia usada para estudar o padrão de decomposição e a estabilidade térmica de polímeros.

Foram pesadas rigorosamente entre 2 a 3 mg de amostra. A análise foi efectuada numa balança termogravimétrica Shimadzu TGA-50. As amostras foram aquecidas deste os 28 °C até aos 600 °C a 10 °C/min, sob uma atmosfera de ar sintético com um caudal de 20 mL/min.

3. RESULTADOS E **DISCUSSÃO**

3.1. Determinação da biomassa produzida

A produção do EPS foi efectuada num meio de cultura optimizado por Tavares *et al.* (2005). Efectuaram-se no total seis ensaios de cultura do fungo neste meio. A concentração de biomassa produzida em cada um dos ensaios determinou-se depois da separação do meio fermentado e encontra-se na Figura 3.1.

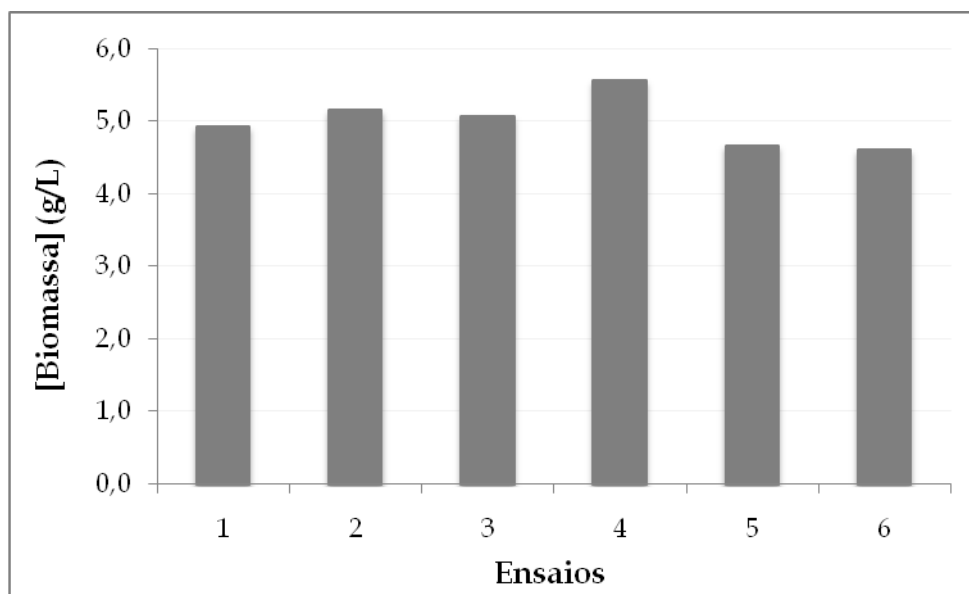


Figura 3.1: Biomassa produzida por *Trametes versicolor* no meio YM optimizado.

A biomassa produzida é idêntica em todos os ensaios efectuados, apresentando um valor médio de $5,0 \pm 0,3$ g/L. Esta produção de biomassa foi muito próxima da obtida por Tavares *et al.* (2005) para o mesmo meio (4,2 g/L).

3.2. Extracção com etanol

3.2.1. Solubilização em água

O polímero foi precipitado em soluções de 80% de etanol e este foi co-evaporado com água.

A solubilização do polímero foi tentada, numa primeira etapa, em água. Após a adição de água e da evaporação do agente precipitante (etanol) o polissacarídeo não se dissolveu, mantendo-se em suspensão. Posteriormente, submeteu-se esta suspensão a 80

°C por 10 min, obtendo-se uma fracção solúvel (EPS_SQ) e outra insolúvel (EPS_IQ). Após separação e liofilização de cada uma, obteve-se $9,1 \pm 0,8$ mg na fracção insolúvel e $4,6 \pm 0,9$ mg na fracção solúvel, verificando-se que a maior massa do polímero não é solúvel em água mesmo a temperaturas elevadas. Deste modo, concluiu-se que o polissacarídeo é solúvel no meio onde o fungo se desenvolve, mas a partir do momento em que é precipitado em etanol deixa de ser solúvel. Segundo a bibliografia encontrada, o exopolissacarídeo produzido pelo fungo *T. versicolor* é solúvel em água (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Jeong *et al.* 2004; Cui *et al.* 2007; Cheng e Leung 2008), solubilidade que neste trabalho não foi verificada.

a) Determinação e identificação dos açúcares neutros

Foi efectuada a análise dos açúcares neutros às fracções solúvel (EPS_SQ) e insolúvel a quente (EPS_IQ). A percentagem molar dos diferentes açúcares encontrados no polissacarídeo encontra-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição em açúcares neutros das fracções insolúvel a 80 °C (EPS_IQ) e solúvel a 80 °C (EPS_SQ).

Amostra	Composição em açúcares (% molar)							% Açúcares na amostra
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
EPS_IQ	1±0	1±0	5±0	1±0	3±2	1±0	88±2	40,9±1,2
EPS_SQ	1±0	2±0	8±0	3±0	19±0	15±0	52±1	29,2±0,1

Verifica-se que as fracções apresentam uma composição em açúcares diferente. A fracção não solúvel a quente (EPS_IQ) é rica em glucose (88%). Apresenta também pequenas quantidades de arabinose (5%) e manose (3%). Existem ainda 4% de outros açúcares, como a xilose, galactose, ramnose e fucose. Relativamente à fracção solúvel (EPS_SQ), a glucose continua a ser o monossacarídeo predominante mas em menor percentagem (52%), comparando com a fracção insolúvel. No entanto, esta fracção apresenta uma maior percentagem dos restantes açúcares. Destes, destacam-se a manose com 19% e a galactose (15%). A fucose, xilose e ramnose também se encontram em maior quantidade nesta fracção relativamente à anterior, mas ainda assim em pequenas quantidades comparando com os restantes monossacarídeos. Pela Tabela 3.1 verifica-se que a amostra EPS_IQ tem 40,9% de açúcares e a amostra EPS_SQ apenas 29,2%.

Devido à elevada quantidade de glucose presente na fracção insolúvel, e pela informação encontrada na bibliografia, pode-se afirmar que é na fracção insolúvel que se encontra a glucana produzida pelo fungo. Na fracção solúvel poderão existir glucomananas e/ou mananas, devido às elevadas quantidades de glucose e manose. Estes polissacarídeos podem ser provenientes de restos de componentes do meio de cultura.

3.2.2. Solubilização em NaOH

Segundo a bibliografia, o *T. versicolor* produz uma (1→3)-β-glucana (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Jeong *et al.* 2004; Cheng e Leung 2008; Lin *et al.* 2008; Rau *et al.* 2009). Existem polissacarídeos com este tipo de ligações, como as curdlanas, que são insolúveis em água, mas são solúveis em soluções alcalinas (McIntosh *et al.* 2005; Grandpierre *et al.* 2008). Deste modo, tentou-se solubilizar o EPS precipitado em etanol em soluções de NaOH. Para avaliar a quantidade de polímero dissolvida foram estudadas diferentes concentrações de EPS (1,0, 2,0 e 5,0 mg/mL). Foi também analisado o efeito da concentração das soluções de NaOH (0,4, 1,0 e 4,0 M). Na Figura 3.2 apresenta-se a percentagem, em peso seco, da fracção solúvel em NaOH (EPS_{Al_S}) consoante as diferentes concentrações usadas.

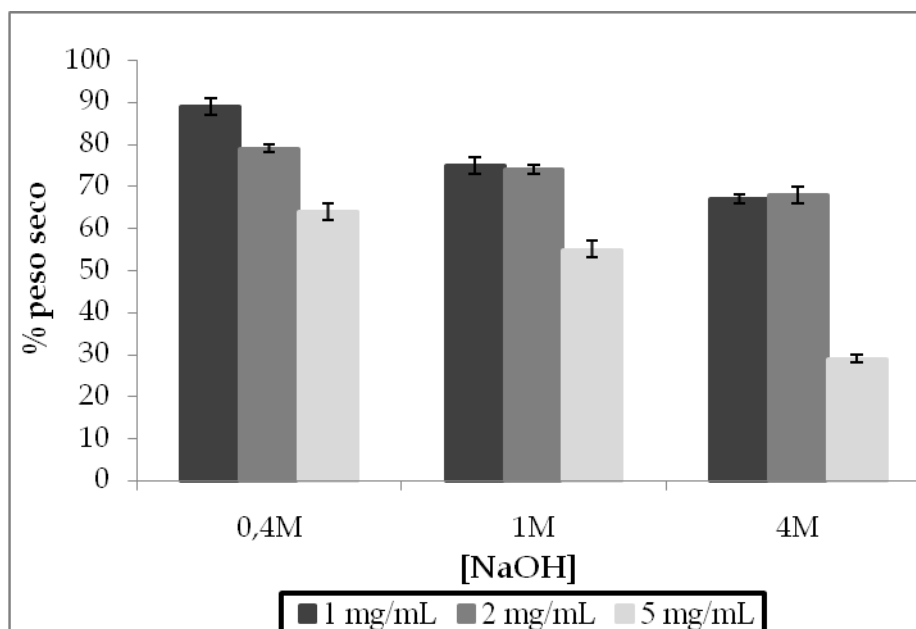


Figura 3.2: Percentagem de EPS, em diferentes concentrações, solúvel em NaOH com várias molaridades.

Resultados e Discussão

Pela análise da Figura 3.2, verifica-se que a quantidade de EPS dissolvido diminui à medida que a sua concentração aumenta. Assim, é com uma concentração de 1,0 mg/mL de EPS que se obtém uma maior percentagem de polímero dissolvido. Na Figura 3.2 verifica-se também que à medida que a concentração de NaOH aumenta, a percentagem de EPS dissolvido diminui, sendo a solução com 0,4 M de NaOH que contém a maior quantidade de EPS dissolvido na maioria das concentrações de polímero analisadas.

Considerando a quantidade de polissacarídeo em solução, obtêm-se as concentrações de polissacarídeo dissolvido nas diferentes soluções de NaOH. Estas concentrações encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Concentrações finais de EPS obtidas após solubilização em soluções de NaOH.

[EPS] (mg/mL)			
[NaOH] (M)	1	2	5
0,4	1,0±0,2	1,6±0,0	3,3±0,0
1,0	0,9±0,0	1,6±0,1	2,9±0,1
4,0	0,6±0,1	1,4±0,0	1,5±0,0

Observando a Tabela 3.2 verifica-se que, nestas condições, se consegue solubilizar no máximo 3,3 mg/mL de EPS. Esta solubilização só foi possível numa solução 0.4 M de NaOH, o que indica que esta é a concentração ideal para solubilizar este polissacarídeo. O facto deste EPS ser solúvel em soluções de NaOH pode indicar que possui uma estrutura tridimensional idêntica à das curdlanas, isto é, pode apresentar uma estrutura em tripla hélice. Estas diferenças de solubilidade em vários meios vêm demonstrar que este EPS pode apresentar diferentes conformações. Quando o EPS é produzido pelo fungo e excretado para o meio de cultura, este deverá encontrar-se numa conformação em hélice simples. No entanto, quando é precipitado em etanol as diferentes hélices agregam-se, formando hélices triplas insolúveis em água mesmo a 80°C mas, solúveis em soluções de NaOH.

a) Cromatografia de exclusão molecular

A fracção extraída com NaOH (EPS_AI_S) e neutralizada com ácido acético, foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular para se determinar a massa molecular do polímero em estudo.

Observando o perfil de exclusão obtido (Figura 3.3), verifica-se que os açúcares totais foram separados dos respectivos sais. Os açúcares são excluídos entre os 83 e os 116 mL (fracções I, II e III), enquanto que os sais são excluídos aos 200 mL (fracção A).

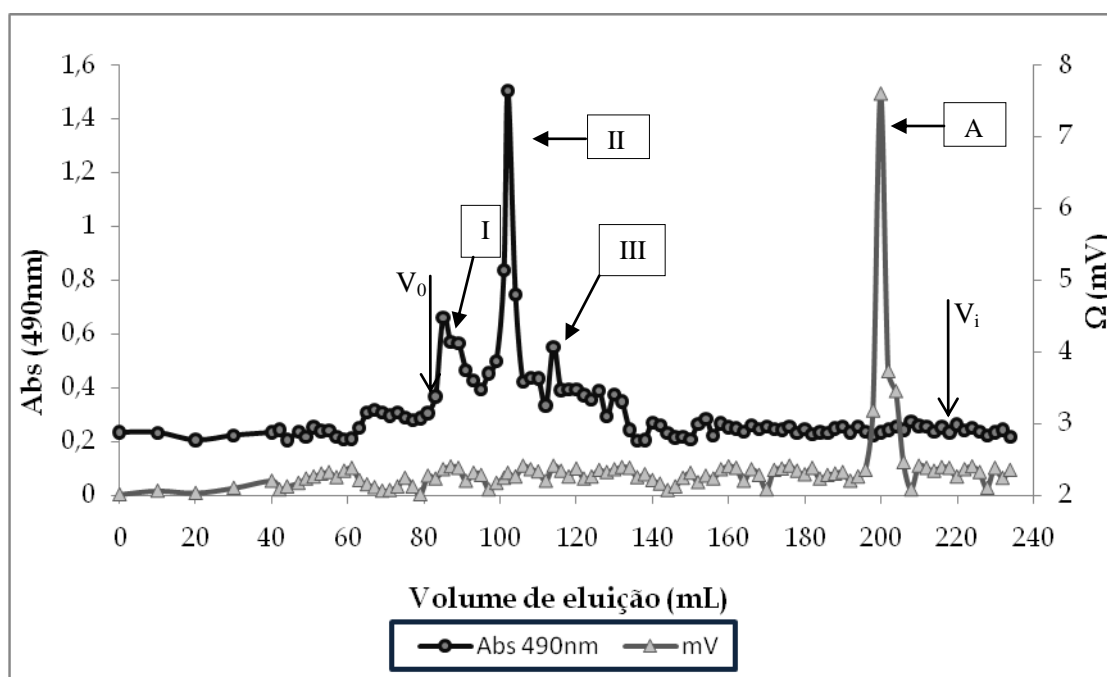


Figura 3.3: Cromatografia de exclusão molecular da fracção solúvel em NaOH (EPS_AI_S) numa coluna Sephacryl S-300 HR.

V_0 - volume morto; V_i - volume de inclusão.

No perfil de exclusão molecular (Figura 3.3) identificam-se três fracções do polissacarídeo. As respectivas massas moleculares foram calculadas com base na calibração efectuada ($\log(M_w)=f(t_r)$) e encontram-se na Tabela 3.3. O grau de polimerização (D.p.) foi também calculado, tendo em conta a massa molecular do resíduo de monossacarídeo maioritário, a glucose ($M_w-18=162$ Da).

Resultados e Discussão

Tabela 3.3: Massas moleculares (M_w) e grau de polimerização (D.p.) das fracções da amostra solúvel em NaOH (EPS_AI_S) separadas com uma coluna de exclusão molecular S-300 HR.

Fracção	$V_{\text{eluição}}(\text{mL})$	$M_w(\text{Da})$	D.p.
I	85	4.9×10^5	3006
II	102	2.3×10^5	1390
III	114	1.3×10^5	807

A fracção com maior concentração de açúcar total é a fracção II, uma vez que é a que apresenta a maior absorvância no teste do fenol-ácido-sulfúrico. Esta tem uma massa molecular de 2.3×10^5 Da, da mesma ordem de grandeza da referida na bibliografia (1.0×10^5 Da) (Ng 1998; Cheng e Leung 2008). As massas moleculares variam entre os 2.3×10^6 e os 2.7×10^3 Da (Cui *et al.* 2007; Rau *et al.* 2009). Esta variação poderá dever-se ao meio de cultura ou à própria metodologia de extracção utilizada. O grau de polimerização varia entre 3006 para a fracção com maior massa molecular e 807 para a menor.

3.3. Extracção por evaporação de água

3.3.1. **Determinação e identificação dos açúcares neutros**

Como é a partir do momento em que se precipita o EPS em etanol que este deixa de ser solúvel, tentou-se modificar a metodologia de recuperação do polissacarídeo, promovendo uma evaporação inicial da água do meio de cultura. Deste modo, pretendia-se obter fracções solúveis e ricas em EPS.

À medida que o meio foi concentrado, formaram-se três precipitados (PP_1, PP_2 e PP_3) e o resíduo final da evaporação (Sb_4). Todas estas fracções foram submetidas a uma diálise. Após este procedimento, obtiveram-se os sobrenadantes dos precipitados obtidos anteriormente (Sb_1, Sb_2 e Sb_3) e um precipitado resultante do resíduo final da concentração (PP_4). A composição em açúcares neutros destas fracções encontram-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Composição em açúcares neutros dos diferentes precipitados (PP) e sobrenadantes (S) obtidos.

Amostra	Rendimento		Composição em açúcares (% mol)							% Açúcares
	m (g)	%	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	na Amostra
PP_1	0,0214	2,1	0±0	1±0	0±0	1±0	9±0	3±0	85±1	57,4±1,8
PP_2	0,0122	1,2	0±0	3±0	1±0	1±0	48±4	13±0	35±4	28,4±1,7
PP_3	0,0028	0,3	0±0	2±0	1±0	1±0	17±3	5±0	75±3	30,1±1,2
PP_4	0,0101	1,0	0±0	4±1	1±0	1±0	46±1	13±1	35±1	25,2±0,3
Sb_1	0,0143	0,4	1±0	5±0	2±0	1±0	44±2	12±3	36±1	15,2±1,2
Sb_2	0,0233	2,3	1±1	4±1	2±0	1±0	42±2	16±3	34±3	29,7±5,5
Sb_3	0,0091	0,9	0±0	4±0	1±0	1±0	47±2	17±4	29±2	19,2±0,2
Sb_4	0,0803	8,0	0±0	3±0	1±0	1±0	52±3	15±2	28±1	28,7±1,2

Em relação aos precipitados, pela Tabela 3.4, observa-se que a glucose é o monossacarídeo maioritário em PP_1 e PP_3 (85% e 75%, respectivamente). Existe também manose (9% e 17%, respectivamente) e galactose em menor quantidade (3% e 5% respectivamente). Os restantes açúcares estão presentes em quantidades inferiores. No caso dos precipitados PP_2 e PP_4, é a manose o açúcar maioritário (45% e 46%, respectivamente). A glucose nestas fracções, existe em menores quantidades que nas anteriores (38% e 34%, respectivamente). Existem ainda 13% de galactose nestas duas fracções.

Os sobrenadantes apresentam todos, uma composição muito idêntica de açúcares. A manose é o que existe em maior quantidade (entre 43% a 49%). A glucose é o segundo mais abundante, com percentagens molares a variar entre os 29% e os 37%. Existe também galactose (entre 14% a 16%). Com estes resultados, pode-se afirmar que os sobrenadantes são compostos por uma mistura de polissacarídeos e que essa mistura tem uma composição homogênea.

Deste modo, e segundo a bibliografia, a glucana fúngica encontra-se principalmente no primeiro precipitado obtido (PP_1). No entanto, não foi possível redissolver os precipitados obtidos mesmo em soluções muito diluídas, apesar dos precipitados PP_2 e PP_4 conterem principalmente mananas, polissacarídeos normalmente solúveis em água (Kath e Kulicke 1999). Esta insolubilidade e a existência de glucose nestas amostras indicam que as mananas podem estar presas na malha polimérica do EPS que precipitou. Contudo, os sobrenadantes apesar de possuírem uma composição idêntica aos precipitados PP_2 e PP_4 são solúveis, provavelmente devido

à existência de diferenças estruturais das mananas. Aquelas que ficam retidas na malha do EPS deverão ser lineares enquanto que, as que ficam solúveis deverão ser ramificadas.

3.3.2. Determinação de ácidos urónicos por HPLC

Segundo Jeong *et al.* (2003), o polissacarídeo produzido por *T. versicolor* não contém ácidos urónicos. Segundo o método colorimétrico foram detectadas percentagens elevadas de ácidos urónicos (35 %), nas amostras obtidas por evaporação de água e dialisadas. No entanto, a coloração das amostras após a adição dos reagentes não coincidia com a coloração habitualmente obtida (vermelho escuro em vez de cor-de-rosa). Como este é um método falível sujeito a diversos interferentes, foi usada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinar a existência de ácidos urónicos.

Em primeiro lugar estudaram-se os tempos de retenção de padrões de ácido glucurónico e galacturónico e de açúcares neutros (manose, glucose e galactose). Foram escolhidos estes açúcares neutros, uma vez que eram os que estavam presentes nas amostras em maior concentração. Os tempos de retenção obtidos estão na Tabela 3.5.

Como se observa na Tabela 3.5, os ácido glucurónico e galacturónico podem ser separados, uma vez que o ácido galacturónico é retido durante mais tempo (1,14 min a mais) do que o ácido glucurónico. A glucose e galactose conseguem também ser separadas, com uma diferença de 1,23 min. No entanto, entre o ácido galacturónico e a glucose não existe uma boa separação, pois diferem entre si apenas em 0,61 min. A galactose e a manose poderão ser co-eluídas, uma vez que a separação entre estes açúcares é de apenas 0,15 min.

Tabela 3.5: Tempos de retenção dos padrões de açúcar, obtidos por HPLC usando a coluna Rezex RCM.

Açúcar	T_{retenção} (min)
Ácido glucurónico	12,61
Ácido galacturónico	13,75
Glucose	14,36
Galactose	15,59
Manose	15,74

Sabendo que os ácidos poderiam ser separados, foram analisadas as diferentes amostras obtidas durante a extracção do polímero por evaporação de água, não tendo sido detectado nenhum tempo de retenção idêntico ao dos padrões dos ácidos usados. Deste modo, conclui-se que as amostras obtidas por concentração do meio não contêm ácidos urónicos.

3.3.3. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Com o objectivo de analisar a presença do polissacarídeo produzido por *T. versicolor*, foi efectuado um estudo da amostra Sb_4, por ressonância magnética nuclear. Esta foi a amostra escolhida, uma vez que era a que existia em maior quantidade e era solúvel em água. Na Figura 3.4 encontra-se o espectro HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) da amostra.

Como o polissacarídeo produzido por este fungo é constituído por uma cadeia principal de resíduos de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 3) (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Jeong *et al.* 2004; Chen e Seviour 2007; Lin *et al.* 2008; Rau *et al.* 2009), seriam de esperar desvios químicos de cerca de 103 ppm no caso do carbono anomérico e de 4,4 ppm para o hidrogénio anomérico (Storseth *et al.* 2006). Este EPS pode conter também resíduos de glucose em ligações α -(1 \rightarrow 4) (Cui e Chisti 2003; Jeong *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006), sendo de esperar desvios químicos de cerca de 5,1 ppm no caso do hidrogénio anomérico (Leal *et al.* 1995; Ghosh *et al.* 2008; Huang e Zhang 2009) e entre os 99 ppm para o carbono anomérico (Ghosh *et al.* 2008; Huang e Zhang 2009). Com base nestes desvios, pode-se observar na Figura 3.4, que a amostra Sb_4 pode conter a glucana produzida pelo fungo. No entanto, são visíveis desvios químicos, a 5 ppm relativamente ao hidrogénio anomérico e entre 97 e 103 ppm no caso do carbono anomérico, indicativos da presença de ligações glicosídicas α (Kath e Kulicke 1999; Kim *et al.* 2000; Storseth *et al.* 2006; Ghosh *et al.* 2008; Ye *et al.* 2009).

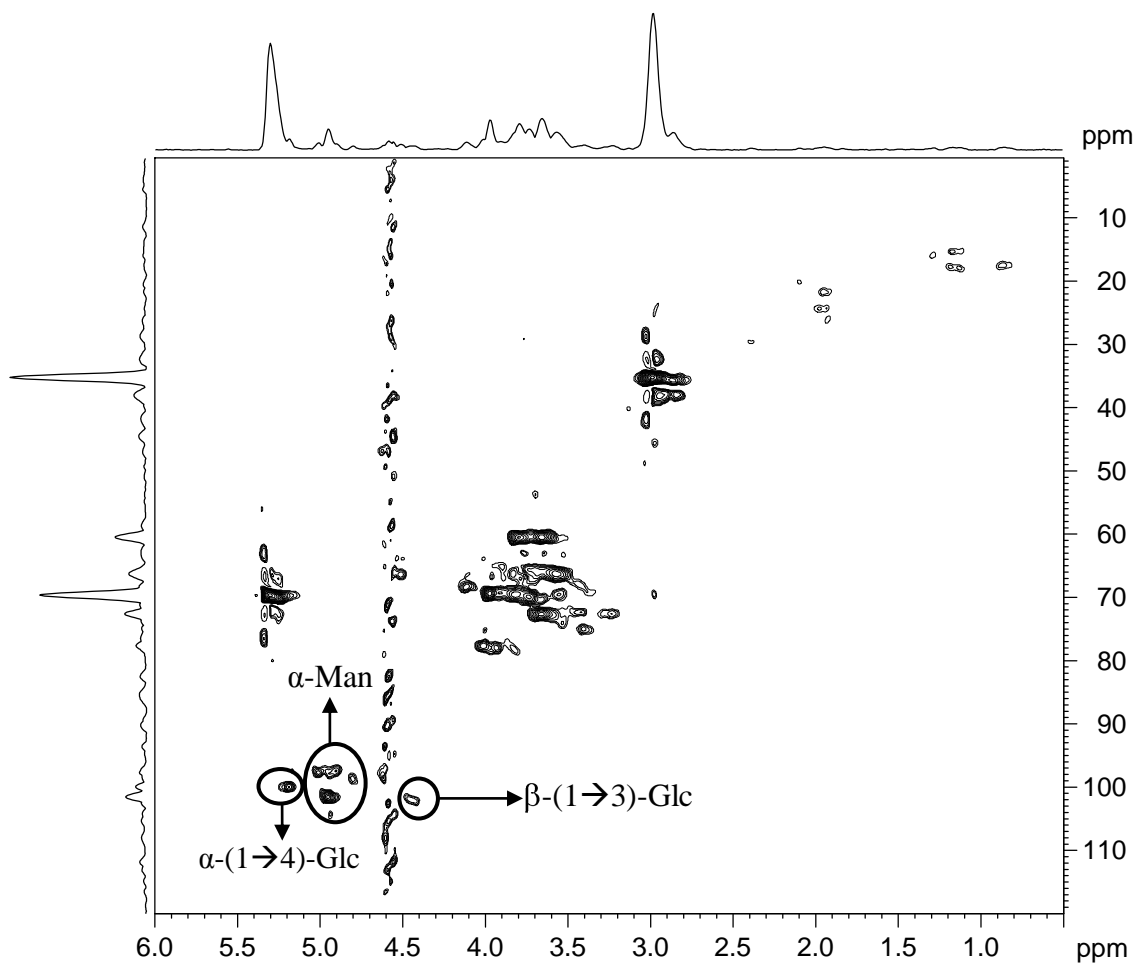


Figura 3.4: Espectro HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) da amostra S_4 liofilizada e redissolvida em D_2O .

Segundo Kath & Kulicke (1999), estes desvios são típicos de mananas, um polissacarídeo encontrado em diversas leveduras, o que vem de encontro à análise de açúcares efectuada (Tabela 3.4) que mostrava uma maior concentração de manose na amostra. Na Tabela 3.6 estão sumariados os principais desvios químicos relativos ao carbono e hidrogénio anoméricos, encontrados no espectro HSQC da amostra Sb_4, cuja atribuição foi feita com base nas referências indicadas.

Tabela 3.6: Principais desvios químicos HSQC (^1H - ^{13}C) da amostra Sb_4, atribuídos com base nas respectivas referências bibliográficas.

Desvios químicos, δ (ppm)			
Resíduos	^1H	^{13}C	Referência
$\rightarrow 3)\beta\text{-D-Glcp}(1\rightarrow$	4,4	103	(Kim <i>et al.</i> 2000)
$\rightarrow 4)\alpha\text{-D-Glcp}(1\rightarrow$	5,1	99	(Ghosh <i>et al.</i> 2008; Huang e Zhang 2009)
$\rightarrow 6)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	5,0	103	(Kath e Kulicke 1999)
$\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	5,0	103	(Kath e Kulicke 1999)
$\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	4,8	97	(Kath e Kulicke 1999)
$\rightarrow 3,2)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	4,8	97	(Kath e Kulicke 1999)

Estes dados demonstram que evaporando a água do meio de cultura, para além do polissacarídeo produzido por *T. versicolor* são também extraídos outros polissacarídeos e oligossacarídeos presentes no meio de cultura. O principal polissacarídeo extraído por este método foram as mananas presentes no extracto de levedura do meio de cultura. Pela análise da Tabela 3.6, verifica-se que estas mananas são ramificadas, o que explica a sua solubilidade no meio.

3.3.4. Análise das ligações glicosídicas

A metilação foi efectuada a todas as amostras disponíveis. Na Tabela 3.7 podem ver-se as ligações encontradas em cada amostra analisada e as respectivas percentagens molares.

Tabela 3.7: Composição das ligações glicosídicas das amostras metiladas.

Amostras					
Ligação	EPS_IQ	EPS_SQ	PP_1	PP_3	Sb_4
2-Rhap	-*	0,8	-	-	-
3-Rhap	-	0,8	-	0,7	1,6
<i>Total</i>	-	1,5	-	0,7	1,6
T Fucp	-	0,4	0,9	0,4	0,8
<i>Total</i>	-	0,4	0,9	0,4	0,8
5-Arap/4-Araf	3,6	1,5	2,7	0,9	1,4
<i>Total</i>	3,6	1,5	2,7	0,9	1,4
T Manp	-	11,4	5,3	8,1	17,5
2-Manp	-	28,7	0,3	0,6	0,7
6-Manp	-	0,6	2,6	0,4	0,2
2,3-Manp	-	-	-	0,4	-
2,6-Manp	-	1,8	3,2	3,3	7,5
3,6-Manp	-	1,1	1,3	1,2	0,8
<i>Total</i>	-	43,2	14,2	14,1	26,7
T Galp	-	1,2	0,4	0,4	0,5
2-Galp	-	10,1	5,4	6,9	16,7
6-Galp	-	4,6	1,8	4,4	7,0
<i>Total</i>	-	15,9	7,2	14,3	24,2
T Glcp	18,4	4,9	25,5	10,6	3,9
2-Glcp	1,7	1,1	0,2	0,2	0,2
3-Glcp	17,8	3,3	14,1	19,8	2,0
4-Glcp	24,3	15,1	21,3	13,0	25,1
6-Glcp	2,6	3,0	2,6	4,0	3,6
2,3-Glcp	8,4	0,2	1,3	2,5	0,1
2,6-Glcp	-	5,3	0,4	4,8	7,0
3,6-Glcp	14,5	4,0	8,7	15,2	2,7
4,6-Glcp	2,2	0,6	-	0,4	0,6
2,3,6-Glcp	5,5	-	-	1,4	-
3,4,6-Glcp	1,0	-	-	0,4	-
<i>Total</i>	96,4	37,4	74,1	72,3	45,2

*não detectada

Pela Tabela 3.7, verifica-se que a amostra EPS_IQ contém resíduos de glucose maioritariamente em ligação (1→4) e (1→3). Existem também ligações (1→2) e (1→6)-Glc_p e (1→5)-Araf / (1→4)-Arap. Estas ligações estão de acordo com o descrito na bibliografia para o polissacarídeo produzido por este fungo (Ng 1998; Jeong *et al.* 2004; Cheng e Leung 2008). A presença das ligações (1→2,3) e (1→3,6)-Glc_p sugere a existência de ramificações em O-2 e O-6, nos resíduos de glucose em ligação (1→3). As ramificações em O-6 são as mais abundantes. Os resíduos detectados em ligação (1→4) também se encontram ramificados em O-6, devido à presença da ligação (1→4,6)-Glc_p. Foram também detectadas ligações (1→3,4,6) e (1→2,3,6)-Glc_p que indicam a existência de resíduos de glucose com duas ramificações. Estes dados demonstram que o EPS produzido pelo fungo estudado é diferente a nível das ligações glicosídicas do PSP e PSK, os EPS mais conhecidos e analisados produzidos por *T. versicolor*. O EPS obtido neste trabalho é maioritariamente constituído por ligações α-(1→4)-Glc_p e β-(1→3)-Glc_p. Nesta análise as proporções dos diferentes açúcares são mantidas quando comparadas com as obtidas na determinação dos açúcares neutros por GC-FID, sendo a glucose o açúcar maioritário.

A amostra EPS_SQ contém diferentes tipos de polissacarídeos, como se verifica pela análise da Tabela 3.7. Entre os resíduos de glucose, a principal ligação observada é a (1→4)-Glc_p. Estes resíduos contêm ramificações no O-6. Existem também quantidades reduzidas de (1→3)-Glc_p, que também contêm ramificações no O-2 e O-6. Ligações (1→6) e (1→2)-Glc_p são também observadas, mas apenas os resíduos em ligação (1→6) possuem ramificações em O-2. Para além desta glucana, esta amostra possui também resíduos de manoses, essencialmente em ligação (1→2)-Man_p, com alguns resíduos ligados em (1→6)-Man_p. Estes últimos resíduos contêm ramificações no O-2 e O-3. Estas ligações são típicas de mananas provenientes de manoproteínas (Kath e Kulicke 1999), o que indica que estas mananas provêm do meio de cultura do fungo, neste caso do extracto de levedura. Foram também detectados resíduos de galactose em ligações (1→2) e (1→6)-Gal_p, provavelmente provenientes também do meio de cultura do fungo. Concentrações reduzidas de (1→2) e (1→3)-Rhap, (1→4)-Araf e fucose terminal foram também detectados, provavelmente encontram-se ligados aos restantes polissacarídeos.

As amostras PP_1, PP_3 e Sb_4 foram obtidas por evaporação de água do meio. A fracção PP_1 contém resíduos de glucose ligados na sua maioria por ligações (1→4) e (1→3)-Glc_p que se encontram ramificados no O-6. Os resíduos ligados em (1→3)-

Glc_p podem também estar ramificados no *O*-2. Estas ligações foram também encontradas na amostra EPS_IQ, o que indica que esta amostra contém uma fracção do EPS, sendo a primeira a precipitar por este método. No entanto, foram também detectadas ligações entre resíduos de manose iguais às da amostra EPS_SQ, o que indica a presença de mananas provenientes do extracto de levedura do meio de cultura. Estas mananas encontram-se ligadas maioritariamente em (1→6)-Man_p, com ramificações em *O*-2 e *O*-3, e em (1→2)-Man_p com ramificações em *O*-3. Existem ainda algumas galactoses ligadas em (1→2) e (1→6)-Gal_p, iguais às encontradas na amostra EPS_SQ.

O precipitado PP_3 contém uma glucana com ligações (1→3) e (1→4)-Glc_p e algumas (1→2) e (1→6)-Glc_p. Foram também detectadas ligações (1→2,3), (1→4,6), (1→3,6) e (1→2,6)-Glc_p que indicam a presença de ramificações, tal como nas amostras anteriores. A existência de ligações (1→3,4,6) e (1→2,3,6)-Glc_p apontam para a existência de duas ramificações no mesmo resíduo de glucose. Esta amostra encontra-se também contaminada com mananas provenientes do extracto de levedura do meio de cultura. As ligações detectadas nestes resíduos são iguais às presentes em amostras anteriores. Na Tabela 3.7 são também visíveis resíduos de galactose com ligações iguais às já registadas em amostras anteriores e alguns resíduos de ramnose em ligação (1→3), (1→5)-Araf / (1→4)-Arap e fucose terminal. Estes resíduos poderão estar ligados à glucana ou manana.

Na amostra Sb_4 é visível uma glucana com ligações (1→4), (1→6) e algumas (1→3) e (1→2)-Glc_p, as mesmas ligações encontradas na amostra EPS_IQ mas em proporções diferentes. As ligações (1→2,3), (1→4,6), (1→3,6) e (1→2,6) sugerem que este polissacarídeo contém diversas ramificações, iguais às já detectadas em amostras anteriores. Nesta amostra existe também resíduos de manose com ligações iguais às encontradas anteriormente. Na Tabela 3.7 são também visíveis resíduos de galactose iguais às já encontradas. Resíduos de ramnose em ligação (1→3), arabinose em (1→4) e fucose terminal são também observados em quantidades reduzidas.

As proporções dos diferentes açúcares presentes nas amostras foram no geral mantidas, quando comparadas com a análise por GC-FID. Apenas no caso da amostra Sb_4 tal não se verificou. Nesta amostra foi detectada uma maior concentração de glucose do que de manose.

Pela análise da Tabela 3.7, verifica-se que na maior parte das amostras a percentagem das ramificações é superior à percentagem de resíduos terminais existentes

o que indica a existência de sub-metilações. Deste modo, esta metilação indica quais as principais ligações presentes das diferentes amostras. A amostra EPS_IQ é constituída principalmente por uma glucana em ligação (1→4) e (1→3). As restantes amostras, para além desta glucana contêm também mananas em ligação (1→2) e (1→6).

3.4. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi efectuada à amostra do EPS precipitado com etanol e insolúvel a quente (EPS_IQ) e ao sobrenadante final obtido pelo segundo método de extracção efectuado (Sb_4). Nas Figura 3.5 e 3.6, encontram-se os gráficos referentes à análise termogravimétrica das amostras EPS_IQ e Sb_4, respectivamente.

Pela Figura 3.5 verifica-se que o EPS é estável até cerca dos 270 °C. Acima desta temperatura a decomposição do polímero ocorre em duas fases. Entre 270 °C e os 350 °C, com um pico aos 318,77 °C, ocorre a primeira perda de massa do polímero. Nesta fase a decomposição é rápida, isto é, o polímero perdeu cerca de 74% da sua massa durante esta fase. Na segunda fase de decomposição ocorre uma perda de massa gradual, desde os 350 °C até aos 500 °C. A partir desta temperatura e até os 600 °C não se verificou mais nenhuma perda de massa. Estes dados são coincidentes com a análise termogravimétrica feita anteriormente por Tavares *et al.* (2005), ao EPS produzido por *T. versicolor*, sugerindo que se trata do mesmo polímero.

Na Figura 3.6 observa-se um padrão de decomposição térmica diferente do anterior. A decomposição começa por volta dos 180°C e termina por volta dos 500°C, distinguindo-se 4 fases com picos a 210,43, 313,07, 438,75 e 497,79 °C. Estes dados sugerem que esta amostra não era o polissacarídeo produzido por *T. versicolor*, indicando que a precipitação por evaporação de água do meio co-precipita também polissacarídeos do meio.

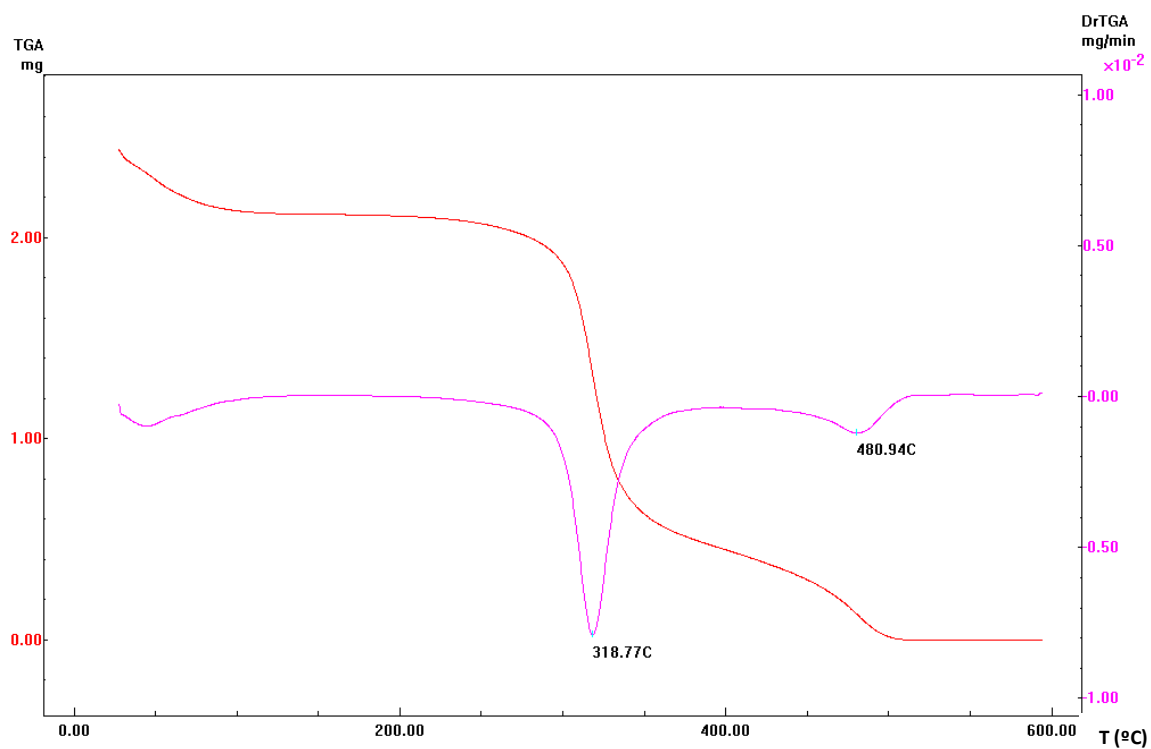


Figura 3.5: Gráfico da análise termogravimétrica da amostra EPS_IQ.

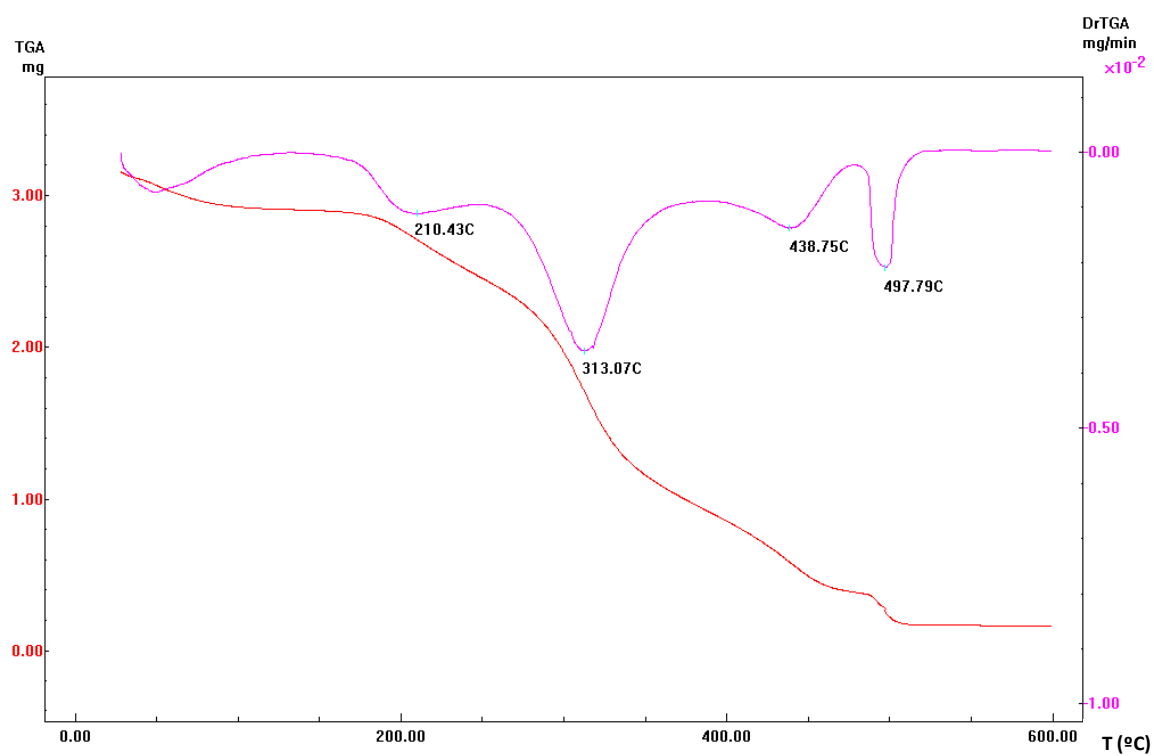


Figura 3.6: Gráfico da análise termogravimétrica da amostra Sb_4.

3.5. Determinação e identificação dos açúcares neutros e comparação de condições de hidrólise

As hidrólises efectuadas a este polissacarídeo, revelaram uma baixa quantidade de açúcares totais. Como é conhecida a resistência de (1→3)- β -glucanas à hidrólise ácida (Grandpierre *et al.* 2008), foi testada uma hidrólise com condições mais severas (H_2SO_4 2 M a 120 °C durante 1 h). Na Tabela 3.8 encontra-se a composição em açúcares neutros da fracção insolúvel a 80 °C (EPS_IQ), sujeita às novas condições de hidrólise.

Tabela 3.8: Composição em açúcares neutros da fracção insolúvel a 80°C (EPS_IQ).

Amostra	Composição em açúcares (% molar)							%Açúcares na amostra
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
EPS_IQ	-*	0±0	1±0	1±0	-	-	98±1	94,8±1,2

*não detectado

Pela análise da Tabela 3.8 pode-se observar que a fracção contém 98% de glucose e 2% de outros açúcares (arabinose e xilose). Fazendo uma comparação entre as duas metodologias de hidrólise efectuadas, verifica-se que existem diferenças, evidenciadas no Figura 3.7.

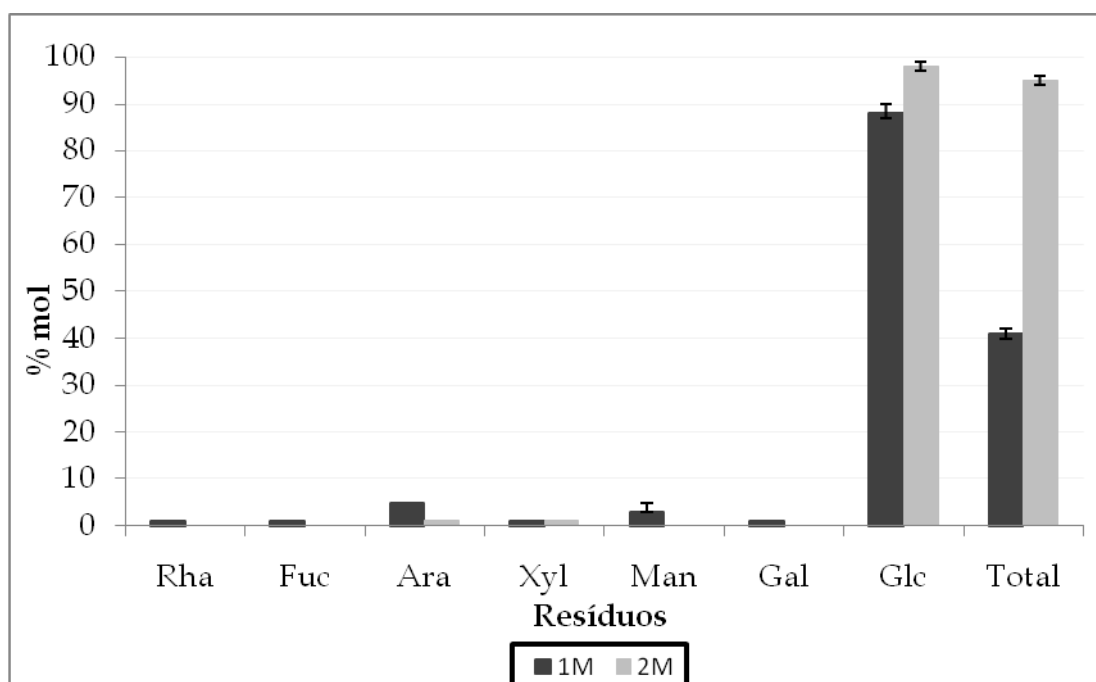


Figura 3.7: Composição em açúcares neutros da fracção insolúvel a 80°C (EPS_IQ) sujeita a hidrólise com H_2SO_4 1M e H_2SO_4 2M.

Pela Figura 3.7 verifica-se que apesar de existirem pequenas diferenças na composição de alguns açúcares, a glucose continua a ser o principal resíduo encontrado, existindo pequenas quantidades de outros açúcares. A principal diferença entre as duas hidrólises efectuadas reside na quantidade de resíduos de açúcares libertados. Durante a hidrólise com H_2SO_4 1 M, apenas se hidrolisou 41% da amostra inicial. Quando se usou H_2SO_4 2 M, a quantidade de açúcar hidrolisado foi mais do dobro da anterior, tendo-se conseguido hidrolisar 94,8% da amostra.

Segundo referências bibliográficas, este polissacarídeo contém uma parte proteica (Ng 1998; Cui e Chisti 2003; Cheng e Leung 2008). A percentagem de açúcar obtido (94,8%) indica que o que resta na amostra poderá ser material proteico.

4. CONCLUSÕES

O exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Trametes versicolor* é insolúvel em água, mesmo quando a dissolução foi tentada a 80°C. Esta insolubilidade poderá dever-se a uma possível mudança de conformação de hélice simples, quando solúvel no meio de cultura, para uma tripla hélice quando é precipitado. Verificou-se também que este polissacarídeo apresentava resistência à hidrólise ácida. Usando condições de hidrólise mais fortes, maior concentração de ácido e temperaturas mais elevadas, conseguiu-se duplicar a quantidade de açúcares totais extraídos. Inicialmente eram extraídos apenas 41% dos açúcares presentes na amostra, usando a nova metodologia da hidrólise extraíram-se 95% dos açúcares. O principal resíduo glicosídico presente na fracção insolúvel a 80 °C deste EPS é a glucose (98%), possuindo ainda 2% de outros monossacarídeos (arabinose e xilose).

Apesar da sua insolubilidade em água, este EPS é solúvel em soluções alcalinas de NaOH. Demonstrando características semelhantes a um polissacarídeo produzido por bactérias, a curdlana, que também é insolúvel em água mas solúvel em soluções alcalinas é resistente à hidrólise ácida. A solução de NaOH a 0,4 M foi a mais eficiente a solubilizar o polímero uma vez que foi nesta solução que se solubilizaram 3,3 mg/mL de EPS.

Na realização deste trabalho conclui-se que o método de extracção de polissacarídeos por evaporação de água do meio de cultura não é o indicado. À medida que o meio de cultura foi concentrado, obteve-se um precipitado rico em glucose e com composição idêntica ao EPS anteriormente descrito. Com este método foi também recolhida uma fracção solúvel que continha 52% de manose, 28% de glucose, 15% galactose, 3% de fucose e 2% de outros açúcares (arabinose e xilose), o que representava 29% de açúcares neutros totais. A análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear, veio demonstrar que esta amostra continha uma elevada quantidade de componentes provenientes do meio de cultura. Apesar de existirem desvios químicos indicativos da presença da glucana produzida por *T. versicolor* (β -(1 \rightarrow 3)-Glc e α -(1 \rightarrow 4)-Glc), os principais desvios eram referentes a uma α -manana ramificada, proveniente de manoproteínas do extracto de levedura. A análise de metilação demonstrou ligações (1 \rightarrow 2) e (1 \rightarrow 6) entre resíduos de manose, o que confirma a presença de mananas.

Este estudo permitiu concluir que este EPS é constituído por 95% de açúcares neutros, 98% dos quais são resíduos de glucose. A massa molecular do EPS foi estimada em 225 kDa. Este EPS demonstrou ser resistente à temperatura até aos 270°C.

Conclusões

A análise de metilação e de RMN revelou que as principais ligações glicosídicas presentes neste EPS, serão possivelmente α -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 3)-Glc_p. Estas ligações fazem com que este EPS possua uma conformação flexível. A alternância entre diferentes conformações é responsável pelas propriedades encontradas neste EPS, nomeadamente ao nível da sua insolubilidade em água e solubilidade em soluções alcalinas e da sua resistência à hidrólise ácida. Quando o EPS é produzido pelo fungo e excretado para o meio de cultura, este deverá encontrar-se numa conformação em hélice simples. No entanto, quando é precipitado em etanol as diferentes hélices agregam-se, formando hélices triplas insolúveis em água mesmo a 80°C mas, solúveis em soluções de NaOH. Estas triplas hélices dificultam também a hidrólise dos açúcares que se encontram no interior da hélice. Deste modo, concluiu-se que o exopolissacarídeo estudado é diferente dos polissacarídeos já descritos na literatura (PSP, PSK e outros).

5. REFERÊNCIAS **BIBLIOGRÁFICAS**

- Asgher, M.,Bhatti, H. N.,Ashraf, M. e Legge, R. L. (2008). "Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system." Biodegradation **19**(6): 771-783.
- Barbosa, A. M.,Cunha, P. D. T.,Pigatto, M. M. e Silva, M. L. C. (2004). "Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos." Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas **25**(1): 29-42.
- Belitz, H. D. e Grosch, W. (1987). "Carbohydrates." Food Chemistry. 2. Berlin, Springer-Verlag.
- Berg, J. M.,Tymoczko, J. L. e Stryer, L. (2002). "Carbohydrates." Biochemistry. 5. New York, W. H. Freeman and Company.
- Blakeney, A. B.,Harris, P. J.,Henry, R. J. e Stone, B. A. (1983). "A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis." Carbohydrate Research **113**(2): 291-299.
- Carey, F. A. (2006). "Carbohydrates." Organic Chemistry. New York, Mc Graw Hill.
- Carlile, J. M.,Watkinson, C. S. e Gooday, W. G. (2001). The Fungi. Great Britain, Academic Press.
- Chan, S. L. e Yeung, J. H. K. (2006). "Effects of polysaccharide peptide (PSP) from *Coriolus versicolor* on the pharmacokinetics of cyclophosphamide in the rat and cytotoxicity in HepG2 cells." Food and Chemical Toxicology **44**(5): 689-694.
- Chen, J. Z. e Seviour, R. (2007). "Medicinal importance of fungal beta-(1 -> 3), (1 -> 6)-glucans." Mycological Research **111**: 635-652.
- Cheng, K. e Leung, P. (2008). "General review of polysaccharopeptides (PSP) from *C. versicolor*: Pharmacological and clinical studies." Cancer Therapy **6**: 117-130.
- Ciucanu, I. e Kerek, F. (1984). "A Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates " Carbohydrate Research **131**(2): 209-217.
- Coimbra, M. A.,Waldron, K. W. e Selvendran, R. R. (1994). "Isolation and characterization of cell wall polymers from olive pulp (*Olea Europaeal*). " Carbohydrate Research **252**: 245-262.
- Cui, J.,Goh, K. K. T.,Archer, R. e Singh, H. (2007). "Characterisation and bioactivity of protein-bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 strains." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **34**(5): 393-402.

Referências Bibliográficas

- Cui, T. e Chisti, Y. (2003). "Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production." Biotechnology Advances **21**(2): 109-122.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. e Smith, F. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." Analytical Chemistry **28**: 350-356.
- Ghosh, K., Chandra, K., Ojha, A. K. e Islam, S. S. (2008). "NMR and MALDI-TOF analysis of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Volvariella diplasia*." Carbohydrate Research **343**(16): 2834-2840.
- Grandpierre, C., Janssen, H. G., Laroche, C., Michaud, P. e Warrand, J. (2008). "Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of beta-(1 -> 3) oligoglucans." Carbohydrate Polymers **71**(2): 277-286.
- Grivet, J. P., Delort, A. M. e Portais, J. C. (2003). "NMR and microbiology: from physiology to metabolomics." Biochimie **85**(9): 823-840.
- Halpern, M. J. (1997). Bioquímica. Lisboa, Lidel.
- Haworth, W. N. (1915). "A new method of preparing alkylated sugars." Journal of the Chemical Society **107**: 8-16.
- Ho, C. Y., Lau, C. B. S., Kim, C. F., Leung, K. N., Fung, K. P., Tse, T. F., Chan, H. H. L. e Chow, M. S. S. (2004). "Differential effect of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on cytokine production by murine lymphocytes in vitro." International Immunopharmacology **4**(12): 1549-1557.
- Huang, Z. P. e Zhang, L. N. (2009). "Chemical structures of water-soluble polysaccharides from *Rhizoma Panacis Japonici*." Carbohydrate Research **344**(9): 1136-1140.
- Jeong, S. C., Yang, B. K., Ra, K. S., Wilson, M. A., Cho, Y., Gu, Y. A. e Song, C. H. (2004). "Characteristics of anti-complementary biopolymer extracted from *Coriolus versicolor*." Carbohydrate Polymers **55**(3): 255-263.
- Kath, F. e Kulicke, W. M. (1999). "Polymer analytical characterization of glucan and mannan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Angewandte Makromolekulare Chemie **268**: 69-80.
- Kim, Y. T., Kim, E. H., Cheong, C., Williams, D. L., Kim, C. W. e Lim, S. T. (2000). "Structural characterization of beta-D-(1 -> 3, 1 -> 6)-linked glucans using NMR spectroscopy." Carbohydrate Research **328**(3): 331-341.

- Landecker, E. M. (1982). Fundamentals of the Fungi. New Jersey, Prentice-Hall.
- Leal, J. A., Jimenezbarbero, J., Gomezmiranda, B., Parra, E., Prieto, A. e Bernabe, M. (1995). "Structural investigation of cell-wall polysaccharides from *Neosartorya* - Relationships with their putative anamorphs of *Aspergillus* " Carbohydrate Research **273**(2): 255-262.
- Lin, F. Y., Lai, Y. K., Yu, H. C., Chen, N. Y., Chang, C. Y., Lo, H. C. e Hsu, T. H. (2008). "Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*." Food Chemistry **110**(2): 446-453.
- McIntosh, M., Stone, B. A. e Stanisich, V. A. (2005). "Curdlan and other bacterial (1 -> 3)-beta-D-glucans." Applied Microbiology and Biotechnology **68**(2): 163-173.
- Moura, M. e Ferreira, M. (2008). "Cogumelo revela eficácia no tratamento de neoplasias do colo do útero " Ciência Hoje Retrieved 22 de Maio de 2009 pelas 12h.40min, 2009, from <http://www.cienciahoje.pt/index.php?oid=26176&op=all>.
- Nelson, D. e Cox, M. (2004). Lehninger Principles of Biochemistry. New York, Worth Publishers.
- Ng, T. B. (1998). "A review of research on the protein-bound polysaccharide (Polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (*Basidiomycetes: Polyporaceae*). " General Pharmacology **30**(1): 1-4.
- Pelczar, M., Chan, E. e Krieg, N. (1997). Microbiologia: Conceitos e Aplicações. Rio de Janeiro, Makron Books.
- Prescott, L., Harley, J. e Klein's, D. (2002). Microbiology, McGraw-Hill.
- Rau, U., Kuenz, A., Wray, V., Nimtz, M., Wrenger, J. e Cicek, H. (2009). "Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor* ATCC 200801." Applied Microbiology and Biotechnology **81**(5): 827-837.
- Rinaudo, M. (2008). "Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials." Polymer International **57**(3): 397-430.
- Roy, B. P. e Archibald, F. (1993). "Effects of Kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism." Applied and Environmental Microbiology **59**(6): 1855-1863.

Referências Bibliográficas

- Sasaki, G. L.,Souza, L. M.,Serrato, R. V.,Cipriani, T. R.,Gorin, P. A. J. e Iacomini, M. (2008). "Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis." Journal of Chromatography A **1208**(1-2): 215-222.
- Schlegel, H. G. (1997). "Los hongos (Fungi/Mycota)." Microbiologia General. 7. Barcelona, Ediciones Omega.
- Selvendran, R. R.,March, J. F. e Ring, S. G. (1979). "Determination of aldoses and uronic-acid content of vegetable fiber " Analytical Biochemistry **96**(2): 282-292.
- Silva, M. L. C.,Martinez, P. F.,Izeli, N. L.,Silva, I. R.,Vasconcelos, A. F. D. e Cardoso, M. S. (2005). "Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas." Química Nova **29**(1): 85-92.
- Storseth, T. R.,Kirkvold, S.,Skjermo, J. e Reitan, K. I. (2006). "A branched beta-D-(1 -> 3,1 -> 6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR." Carbohydrate Research **341**(12): 2108-2114.
- Tavares, A. P. M.,Agapito, M. S. M.,Coelho, M. A. Z.,Coelho, M. A. Z.,Silva, J. A. L.,Barros-Timmons, A.,Coutinho, J. A. P. e Xavier, A. M. R. B. (2005). "Selection and optimization of culture medium for exopolysaccharide production by *Coriolus* (*Trametes*) *versicolor*." World Journal of Microbiology & Biotechnology **21**(8-9): 1499-1507.
- Xavier, A.,Tavares, A. P. M.,Agapito, M. S. M. e Evtuguin, D. V. (2008). "Sequential batch reactor for eucalypt kraft pulp effluent treatment with *Trametes versicolor*." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **83**(12): 1602-1608.
- Ye, L. B.,Zhang, J. S.,Yang, Y.,Zhou, S. A.,Liu, Y. F.,Tang, Q. L.,Du, X. J.,Chen, H. e Pan, Y. J. (2009). "Structural characterisation of a heteropolysaccharide by NMR spectra." Food Chemistry **112**(4): 962-966.
- Zhang, M.,Cui, S. W.,Cheung, P. C. K. e Wang, Q. (2006). "Polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity." Trends in Food Science & Technology **18**(1): 4-19.
- Zhou, X. W.,Jiang, H.,Lin, J. e Tang, K. X. (2007). "Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extracts on human liver cancer and breast cancer cell line." African Journal of Biotechnology **6**(15): 1740-1743.